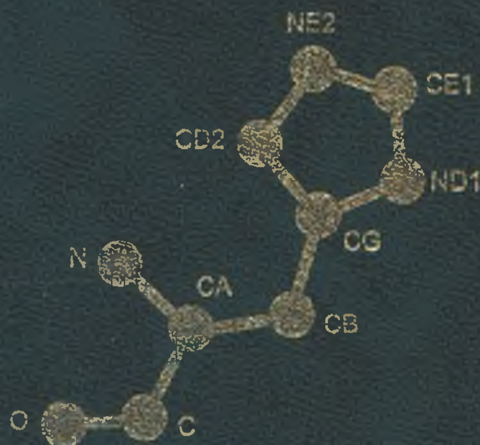
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE
Nicolae TESTEMIŢANU

BIOCHIMIE

Lucrări practice



Chişinău
2002

MINISTERUL SĂNĂTĂŢII AL REPUBLICII MOLDOVA

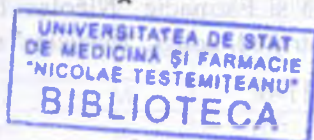
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ŞI FARMACIE

Nicolae TESTEMIŢANU

Catedra Biochimie

BIOCHIMIE

Lucrări practice



Chişinău

Centrul Editorial-Poligrafic *Medicina* al USMF

2002

CZU 577.1(076.5)
B 53

Aprobat de Consiliul Metodic Central al USMF *Nicolae Testemițanu* cu nr. 1 din 27.09.01

Colectivul de autori:

L. Lîsîi – prof. univ.; *Gh. Ivasi, Sv. Bobkova, M. Ștefirță, A. Ambros, O. Tagadiuc, V. Horneț* – conferențiari; *S. Stratulat, Iu. Stratulat* – lectori superiori; *Sv. Protopop, V. Bandalac* – asistenți.

Redactor coordonator: ***Lidia Ciobanu***
Redactor: ***Silvia Vulpe***
Paginare computerizată: ***Svetlana Cersac***

Descrierea CIP a Camerei Naționale a Cărții

Biochimie: Lucrări practice / L. Lîsîi. Gh. Ivasi, S. Bobkova, ...; Univ. de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu". Catedra Biochimie.– Ch.: Centrul ed.-poligr. "Medicina" al USMF, 2003.– 264 p.

ISBN 9975–907–11–3
500 ex.
577.1(076.5)

ISBN 9975–907–11–3

Simbolurile aminoacizilor
(o literă şi trei litere)

Aminoacidul	O singură literă	Trei litere
Alanine	A	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartic acid	D	Asp
Cysteine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glutamic acid	E	Glu
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Methionine	M	Met
Phenylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Serine	S	Ser
Threonine	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

FRACŢII ŞI MULTIPLI

Fracţia	Prefixul	Simbolul	Multiplul	Prefixul	Simbolul
10^{-1}	deci	D	10	deca	Da
10^{-2}	Centi	C	10^2	Hecto	H
10^{-3}	Mili	M	10^3	Kilo	K
10^{-6}	Micro	µ	10^6	Mega	M
10^{-9}	NANO	N	10^9	Giga	G
10^{-12}	Pico	P	10^{12}	Tera	T
10^{-15}	Femto	F	10^{15}	Peta	P
10^{-18}	Atto	A	10^{18}	Exa	E
10^{-21}	Zepto	Z	10^{21}	Zetta	Z
10^{-24}	Yocto	Y	10^{24}	Yotta	Y

Prefață la ediția a doua

Prezenta culegere de lucrări practice la biochimie este alcătuită în conformitate cu modificările intervenite în ultimii ani în programa de studii și în planul metodic la disciplina biochimie. În ea sunt descrise metodele contemporane unificate de cercetări biochimice privind activitatea enzimelor și conținutul metaboliților în obiectele biologice; sunt date valorile normale ale principalilor metaboliți și cele înregistrate în diferite patologii. Metodele expuse au fost verificate în timpul acivității practice a studenților în cadrul catedrei de biochimie.

O atenție deosebită se acordă activității independente a studenților care prevede efectuarea individuală a fiecărei experiențe, rezolvarea unor cazuri clinice și situații de problemă. Răspunsurile date la sfîrșitul lucrării vor da posibilitate studenților să-și verifice cunoștințele, să-și autoaprecieze gradul de însușire a materiei de studii.

Sperăm că prezenta lucrare va asigura o bună pregătire viitorilor medici în vederea interpretării corecte a diferitor indici biochimici în starea clinică a bolnavilor.

INTRODUCERE

Cunoaşterea componenţei chimice şi organizării structurale a biopolimerilor, rolului acestora în realizarea funcţiilor fiziologice are o importanţă decisivă în pregătirea teoretică a viitorului medic. De aici rolul de frunte al biochimiei în sistemul de pregătire fundamentală a viitorilor medici.

Realizările obţinute de biochimia modernă au lărgit cunoştinţele cu privire la patogeneza proceselor patologice şi asigură înţelegerea esenţei acestora la nivel molecular. Integrarea interdisciplinară a cunoştinţelor în învăţămîntul medical va permite pregătirea specialiştilor care vor asigura legătura permanentă între ştiinţele fundamentale şi medicina clinică.

Metodele descrise sunt grupate pe capitole în conformitate cu programa cursului de biochimie, oferind studenţilor posibililatea de a-şi forma deprinderi practice paralel cu însuşirea cunoştinţelor teoretice.

Fiecare capitol are cîteva teme şi începe cu o scurtă introducere teoretică. În cadrul fiecărei teme sînt descrise metode tehnice şi reacţii de laborator (principiul, modul de lucru şi importanţa clinico-diagnostică), privind determinarea calitativa şi cantitativa a metaboliţilor principali, precum şi a activităţii diferitelor enzime în obiecte biologice.

La sfîrşitul temelor se propun întrebări pentru autopregătire şi autocontrol, precum şi situaţii de probleme teoretice şi clinice.

Scopul de bază al materialului metodic prezentat este formarea şi dezvoltarea la viitorul specialist a unui nivel înalt de cunoştinţe, priceperi şi deprinderi practice în interpretarea corectă a indicilor biochimici.

În urma studierii cursului de biochimie teoretică şi practică studentul trebuie ***să cunoască:***

– Principiile metodelor de cercetare a activităţii enzimelor şi metaboliţilor în obiecte biologice, importanţa practică a acestor metode.

– Valorile principalilor indici biochimici ai lichidelor biologice în sistemul SI şi modificările acestora în diferite stări patologice.

STUDENTUL TREBUIE SĂ POSEDE CAPACITATEA DE A:

– folosi în lucru diferite utilaje de laborator şi aparate (centrifuga, ionometrul, fotoelectrocolorimetrul, spectroscopul, polarimetrul etc.);

– determina activitatea enzimelor în obiecte biologice: amilazei, lactatdehidrogenazei, aldolazei, fosfatazelor, aminotransferazelor, dehidrogenazelor ciclului Krebs, catalazei, fosfolipazelor, lipazei, carbo-anhidrazei;

– determina conţinutul diferitor metaboliţi în obiecte biologice: glucozei, ureei, acidului uric, proteinelor, creatininei, hemoglobinei, lipidelor, colesterolului, prolinei şi hidroxiprolinei (sumar), acizilor sialici, piruvatului, clorurilor, calciului, bilirubinei, indicanului, acizilor biliari, corpilor cetonici, ionului rodanid, acidităţii sucului gastric, părţilor componente ale nucleoproteidelor; unor vitamine (A, C, B_1, B_2), hormoni (adrenalina, tiroxina, 17-cetosteroizii);

– rezolva probleme de situaţie teoretice şi clinice în care, paralel cu cercetările de laborator, studentul dispune şi de unele date obiective şi subiective privind starea bolnavului. Rezolvînd asemenea probleme, studentul învaţă să aplice cunoştinţele teoretice acumulate în situaţii clinice.

Interpretarea clinică a modificărilor biochimice survenite în organismul bolnavului permite studentului medic să integreze cunoştinţele şi deprinderile practice acumulate în decursul studierii biochimiei în viitoarea activitate practică.

Bibliografie

Literatura de bază

1. Stroev E. A. “Biochimia”.– Chişinău, Lumina, 1990.

2. Березов Т. Т., Коровкин Б. Ф. Биологическая химия.– Медицина, 1990.

3. Кушманова О. Д. Ивченко Г. М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии.– М.: Медицина, 1983.

4. Lîsîi L. T., Ivasi Gh. I., Mucuţa A. P. Biochimie în teste.– Chişinău, 1997.

5. Lisîi L. T. Biochimie.– Chişinău, 1999.

6. Aleinicova T. L., Rubţova G. V.– M., 1988.

7. Andrews A. T., (tr. eng. R. Vasilico). Teorie, tehnici şi aplicaţii biochimice şi clinice.– Bucureşti, 1996.

8. Р. Досон. Справочник биохимика.– М., 1991.

9. Filip M. Teste de biochimie medicală cu răspunsuri preformate şi comentate.– Iaşi, 1991.

10. Dinu Veronica. Teste de biochimie medicală.– Bucureşti, 1991.

11. Lucrări practice de biochimie.– USM, Chişinau, 1991.

Literatura suplimentară

1. Lehninger A. Bazele biochimiei.– M., 1985.

2. Straier L. Biochimia.– M., 1984.

3. L. White ş.a. Bazele biochimiei.– M., 1981.

4. B. Alberts ş.a. Biologia moleculară a celulei.– M., 1987.

5. Metodele de cercetare în clinică. Sub redacţia lui Menşicov V.– M., 1987.

6. Nicolaev A. I. Biochimia.– 1989.

7. Radu Mihai Vasile. Sistemul internaţional de unităţi în medicină.– Bucureşti, 1986.

CAPITOLUL I

Structura şi funcţiile proteinelor. Enzimele

Partea I. Proteinele

Din toţi compuşii organici proteinele au cea mai complexă structură şi prezintă cel mai important component al materiei vii.

Proteinele sunt heteropolimeri ai α-aminoacizilor cu o masă moleculară mare. Legîndu-se între ei prin legătura peptidică –CO–NH–, ei formează lanţuri polipeptidice. Legătura peptidică apare ca rezultat al reacţiei dintre gruparea carboxil a unui aminoacid şi gruparea amino a altuia. Reacţia este însoţită de eliminarea unei molecule de apă. La hidroliza totală a moleculei proteice are loc ruperea legăturilor peptidice şi obţinerea unui amestec de α-aminoacizi.

Varietatea colosală de proteine în natură este determinată de componenţa aminoacidă şi de succesiunea aminoacizilor în catena polipeptidică. Pentru fiecare proteină este caracteristică o anumită succesiune a resturilor de aminoacizi care şi este considerată ca *structură primară* a moleculei proteice. Lanţul polipeptidic de regulă se răsuceşte în formă de spirală formând *structura secundară* a moleculei proteice. Aceasta la rîndul său se răsuceşte într-un mod complicat, dar strict specific, căpătînd o configuraţie spaţială numită *structură terţiară*.

Unele molecule proteice sunt formate din cîteva lanţuri polipeptidice, de obicei perechi, identice sau diferite de structura primară, secundară şi terţiară, care poartă denumirea de subunităţi sau protomeri. Ele formează un tip de molecule proteice cu proprietăţi fizico-chimice şi biologice specifice din punct de vedere structural şi funcţional. Acest nivel de structură a moleculei proteice poartă denumirea de *structură cuaternară*.

Pentru menţinerea configuraţiei spaţiale, molecula proteică mai are nevoe de unele legături suplimentare. Mai importante sunt legăturile de hidrogen, care apar între atomii de hidrogen ai grupării –NH- (sau –CH-) şi atomii de oxigen ai grupării –CO-, disulfidice (-S-S-) şi ionice, care apar între grupările amino cu sarcini pozitive ale acizilor diamino-monocarboxilici şi grupările carboxil cu sarcini negative ale acizilor monoaminodicarboxilici.

Structura moleculei proteice este foarte labilă şi se modifică uşor sub acţiunea factorilor fizici şi chimici. Ca rezultat al acestor acţiuni se modifică proprietăţile fizice, chimice şi biologice ale moleculei.

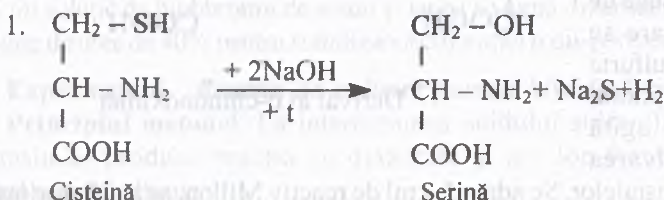
Este necesar de a putea folosi cunoştinţele despre structura, proprietăţile fizice şi chimice ale proteinelor, funcţiile lor, componenţa proteică a organelor şi ţesuturilor în normă şi în diferite leziuni în vederea elucidării funcţiilor organismului în normă şi tulburarea lor în patologie.

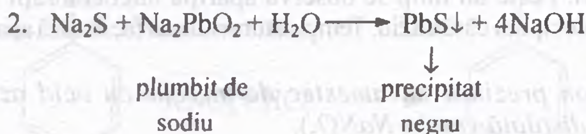
TEMA 1

Importanţa biochimiei pentru medicină.
Aminoacizii. Reacţiile de culoare ale proteinelor şi aminoacizilor

Experienţa 1. ***Reacţia de identificare a aminoacizilor ce conţin sulf legat slab*** (*reacţia Fol*).

Principiul metodei. La degradarea proteinelor şi peptidelor sub acţiunea hidroxidului de sodiu din grupările sulfhidril se eliberează sulful sub formă de sulfură de sodiu, care reacţionînd cu plumbitul de sodiu, formează precipitatul de sulfură de plumb (PbS) de culoare neagră sau brună. Ecuaţia reacţiei:

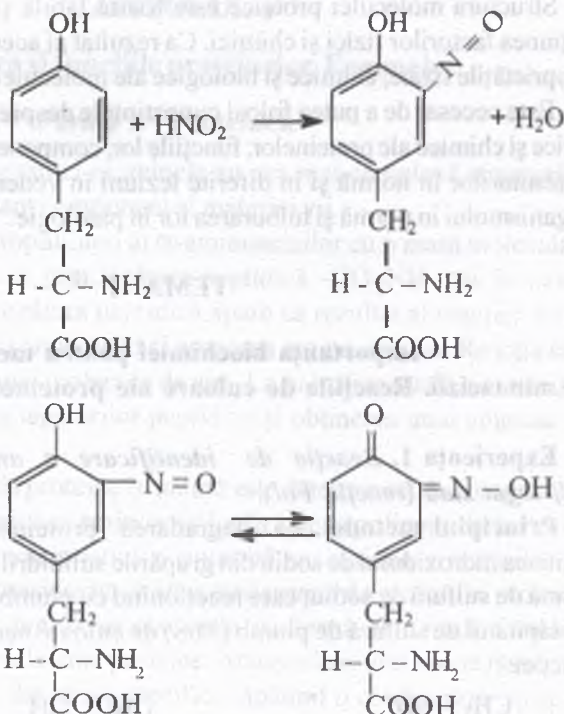




Metionina, spre deosebire de cisteină şi cistină, nu dă această reacţie, deoarece sulful în acest aminoacid este legat trainic.

Mod de lucru. La 5 picături de ovalbumină se adaugă 5 picături de reactiv Fol. Amestecul se pune la fiert. După 1–2 minute de fierbere apare un precipitat negru sau brun de sulfură de plumb (PbS).

Reactivul Fol prezintă un amestec de volume egale de acetat de plumb de 5% şi NaOH de 30%.



Derivat al o-chinonoximei

Experienţa 2. ***Reacţia de culoare pentru tirozină*** (*reacţia Millon*).

Principiul metodei. Reactivul Millon la cald dă cu tirozina o coloraţie roşie. Reacţia este caracteristică aminoacizilor care au în structură un nucleu fenolic.

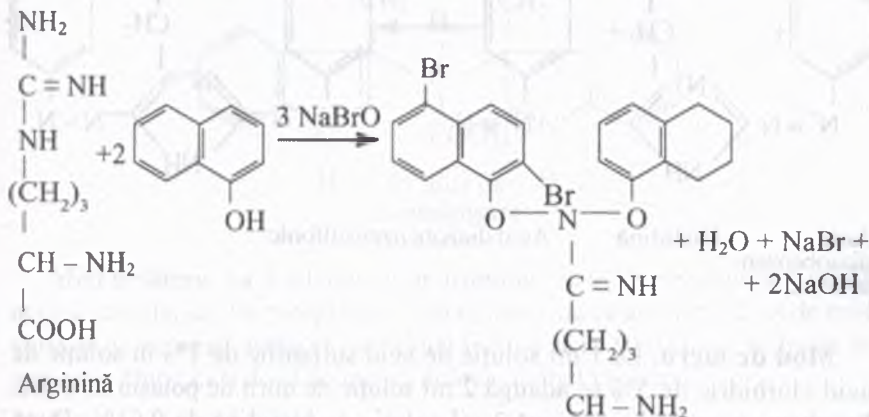
Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau cîteva cristale de tirozină la care se adaugă acid sulfuric de 2,5%. Conţinutul eprubetei se agită pînă la dizolvarea completă a cristalelor. Se adaugă 1 ml de reactiv Millon, se agită şi se lasă la temperatura camerei. Peste un timp se observă apariţia unei coloraţii rozroşiatice sau a unui precipitat cărămiziu. Temperatura ridicată facilitează apariţia coloraţiei.

Reactivul Millon prezintă un amestec de mercur cu acid azotic concentrat şi apă distilată (puţin $NaNO_2$).

Experienţa 3. ***Reacţia de culoare pentru arginină*** (*Reacţia Sakaguci*).

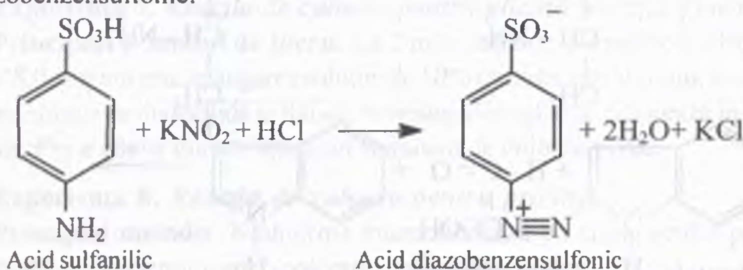
Principiul metodei. Arginina, fiind tratată cu α-naftol în prezenţa hipocloritului de sodiu sau hipobromitului de sodiu, dă o coloraţie roşie caracteristică. Reacţia este specifică grupării guanidinice din structura argininei. La oxidarea de mai departe a naftolargininei se formează un compus de tipul chinoniminei.

Derivații chinoniminei (în cazul de față naftochinonimina), la care hidrogenul grupării iminice este substituit de un radical alchil sau aril, întotdeauna sunt colorați în nuanțe galben-roșiatice. Culoarea roșie-portocalie a soluției în cazul reacției Sakaguci se explică prin apariția derivatului naftochinoniminei.



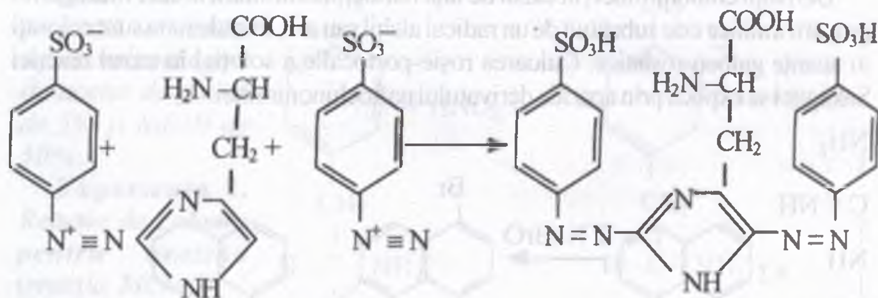
Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 2 ml soluție de 0,01% de arginină la care se adaugă 2 ml soluție de hidroxid de sodiu de 10% și cîteva picături soluție alcoolică de α–naftol de 0,2%. Conținutul eprubetei se agită bine și se adaugă 0,5 ml soluție de hipobromit de sodiu și iarăși se agită. Imediat se adaugă 1 ml soluție de uree de 40% pentru stabilizarea colorației roșii-portocalii apărute.

Experiența 4. ***Reacția de culoare pentru histidină*** (*reacția Pauli*).
Principiul metodei. La interacțiunea acidului sulfanilic cu nitrit de potasiu se produce reacția de diazotare și are loc formarea acidului diazobenzensulfonic:



Acid sulfanilic Acid diazobenzensulfonic

În reacția dintre histidină și acidul diazobenzensulfonic format se obține o colorație roșie-vișinie:

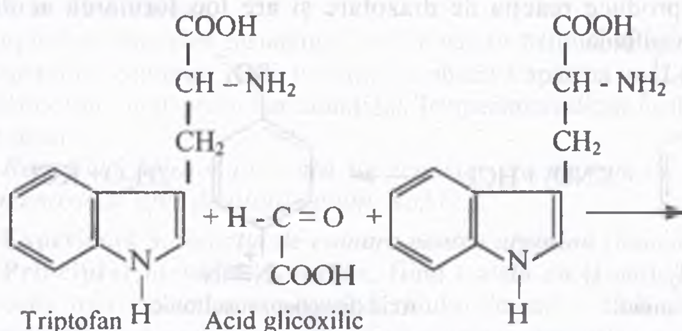


Acid diazobenzen-sulfonic Histidină Acid diazobenzensulfonic

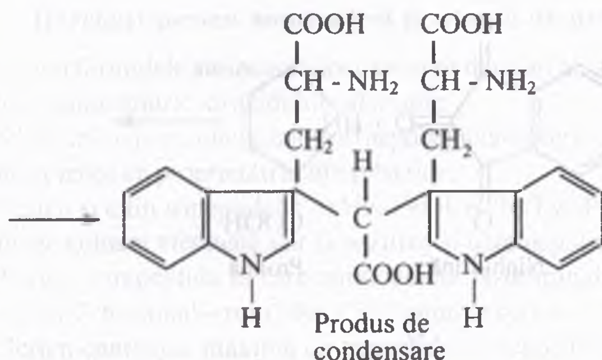
Mod de lucru. La 1 ml soluţie de acid sulfanilic de 1% în soluţie de acid clorhidric de 5% se adaugă 2 ml soluţie de nitrit de potasiu de 0,5%. Eprubeta se agită şi se adaugă 2 ml soluţie de histidină de 0,01%. După agitare se mai adaugă 6 ml soluţie de carbonat de sodiu de 10%. Apare o coloraţie roşie-vişinie.

Experienţa 5. ***Reacţia de culoare pentru triptofan*** (***reacţia Adankiewick-Hopkins***).

Principiul metodei. Soluţiile de triptofan fiind tratate cu acid glioxilic în prezenţa acidului sulfuric concentrat formează la nivelul zonei de contact un inel violaceu. Reacţia este specifică inelului indolic.



Triptofan Acid glicoxilic



Mod de lucru. La 5 ml soluţie de triptofan de 0,5% se adaugă 3 ml de acid acetic glacial. Pe pereţii eprubetei se introduc cu atenţie 2-3 ml de acid sulfuric concentrat, astfel ca cele două lichide să se stratifice. La limita de separaţie dintre cele două soluţii va apărea un inel violaceu.

Experienţa 6. ***Reacţia de culoare pentru metionină*** (*după Mack-Karty şi Sallivan*).

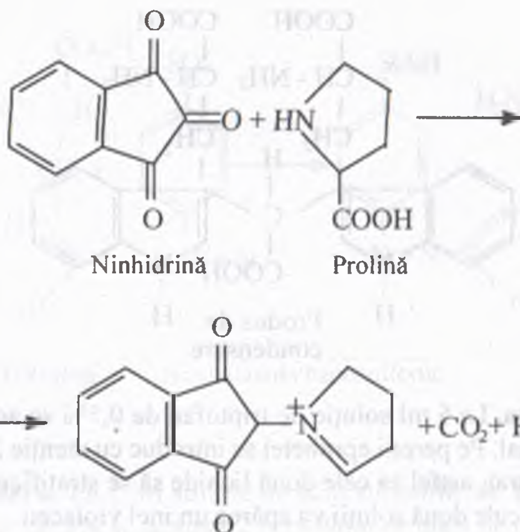
Principiul şi modul de lucru. La 5 ml soluţie de metionină de 0,02% se adaugă prin agitare mai întâi 1 ml soluţie de hidroxid de sodiu de 14,3 N, apoi 0,3 ml soluţie proaspăt pregătită de nitroprusid de sodiu de 0,1%. Amestecul se încălzeşte timp de 10 min pe baia de apă la temperatura de 35–40°C. Apoi eprubeta se răceşte sub un jet de apă rece timp de 2 minute şi se adaugă prin agitare 5 ml de amestec de acid clorhidric şi fosforic. Eprubeta se agită 1 minut şi se răceşte 10 minute. Apare o coloraţie roşie-violetă.

Experienţa 7. ***Reacţia de culoare pentru glicină*** (*reacţia Ţimerman*).

Principiul şi modul de lucru. La 2 ml soluţie de glicină de 0,01% la un pH = 8,0, obţinut prin adăugarea soluţiei de 10% de hidroxid de sodiu, se adaugă 0,5 ml soluţie de dialdehidă o-ftalică. Amestecul imediat se colorează în verde-aprins. Peste cîteva minute apare un sediment de culoare verde.

Experienţa 8. ***Reacţia de culoare pentru prolină.***

Principiul metodei. Ninhidrina interacţionează cu aminoacidul prolina. Produsul de condensare are o coloraţie galben-deschisă:



Mod de lucru. La 3 ml soluţie de prolină de 0,01% se adaugă cîteva picături soluţie de ninhidrină de 1% în acetonă de 95%. Conţinutul eprubetei se agită şi se încălzeşte pe baia de apă la temperatura de 70°C timp de 5 minute.

Teme pentru autopregătire

1. Obiectul biochimiei şi importanţa ei în medicina practică. Metodele de studiu biochimice.
2. Particularităţile materiei vii.
3. Proprietăţile generale ale biomoleculelor.
4. Rolul biologic al proteinelor.
5. Structura şi clasificarea aminoacizilor; tipul de legătură în molecula proteică.
6. Teoria polipeptidică a structurii proteinelor, esenţa ei şi dovezile experimentale.
7. Notarea şi citirea aminoacizilor în peptide şi proteine. Aminoacizii «N» şi «C» terminali.
8. Principiul reacţiilor de culoare ale proteinelor şi aminoacizilor.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Scrieţi formulele aminoacizilor care sunt derivaţi ai: a) acidului propionic; b) acidului butiric; c) acidului valerianic.

2. Scrieţi formulele aminoacizilor: a) nepolari hidrofobi; b) nepolari hidrofili; c) aminoacizilor cu proprietăţi acide şi bazice.

3. Scrieţi şi citiţi tripeptidele: a) His-Fen-Cis; b) Tyr-Pro-Arg. Care din reacţiile de culoare efectuate vor fi pozitive şi care negative?

4. Scrieţi tetrapeptida la care aminoacidul N-terminal să fie prezentat prin Trp, iar C-terminal – prin Met. Citiţi peptida scrisă.

5. Scrieţi cantitatea maximă de tripeptide care pot fi compuse din trei aminoacizi indicaţi: Gli, Ala, Ser - cu condiţia că fiecare aminoacid poate să ocupe oricare din cele trei poziţii şi că fiecare aminoacid poate fi folosit numai o singură dată (pentru scrierea peptidelor de folosit indicarea prescurtată a aminoacizilor - prin trei litere). De exemplu, Gli-Ala-Ser; Ser-Gli-Ala; Ala-Ala-Gli etc.

6. Se poate considera ca compusul cercetat este o peptidă, dacă reacţia cu ninhidrină este negativă, iar reacţia biuretică - pozitivă?

7. Reacţia Fol cu lichidul biologic este pozitivă. Se poate afirma că substanţa este o proteină?

8. Putem identifica prezenţa aminoacizilor liberi în soluţie avînd la dispoziţie numai reactivi pentru proba cu ninhidrină? Motivaţi răspunsul.

9. Cum se poate stabili încheierea hidrolizei proteinei cu ajutorul reacţiei biuretice? Ce culoare va apărea şi pe baza cărui compus?

10. Ce mediu se va crea la dizolvarea în apă a următoarelor tripeptide: a) Ala-Ser-Cis; b) Arg-His-Lyz; c) Glu-Cis-Asp. Scrieţi grupele funcţionale ale radicalilor aminoacizilor care determină pH-ul mediului. În ce mediu se va afla punctul izoelectric al acestor peptide?

11. Amestecul de glicină, alanină, acid glutamic, lizină, arginină şi serină a fost supus electroforezei la pH 6,0. Răspundeţi la următoarele întrebări şi motivaţi răspunsul: Care din aminoacizi vor migra spre catod? Care spre anod? Care vor rămîne la locul de start?

12. În ce direcţie va migra histidina supusă electroforezei la folosirea soluţiei tampon cu diferite valori ale pH-ului: a) pH = 4,0. b) pH=12,0. Scrieţi formula aminoacidului şi motivaţi răspunsul.

13. Scrieţi o tripeptidă al cărei punct izoelectric se va afla în mediu alcalin. Motivaţi răspunsul.

14. Scrieţi o tripeptidă (de scris formulele aminoacizilor) al cărei punct izoelectric se va afla în mediu acid.

TEMA 2

Structura chimică şi rolul biologic al proteinelor

Experienţa 1. ***Identificarea aminoacizilor prin metoda cromatografiei pe hîrtie.***

Principiul metodei. Metoda se bazează pe diferenţa coeficientului de repartiţie a aminoacizilor în apă şi solvent organic (butanol), care nu se amestecă cu apa. Viteza migrării aminoacizilor pe hîrtie este direct proporţională cu gradul de dizolvare în butanol.

Mod de lucru. Pe linia de start a benzii de hîrtie cromatografică cu ajutorul unui capilar se aplică o picătură mică (diametrul nu mai mare de 5 mm) de hidrolizat proteic sau amestec de aminoacizi. După uscare la aer (fixare) banda se introduce în vasul cu amestecul de apă-butanol, astfel, încît lichidul să ajungă numai pînă la linia de start (2–3 mm). Cu ajutorul dopului, banda se fixează vertical fără să se atingă de pereţii vasului. După 1,5 ore de expunere la temperatura camerei, banda se scoate din vas, se notează cu un creion simplu hotarul solventului şi se usucă în termostat (10 minute la temperatura de 70–100°C). Apoi banda se trece prin soluţie de ninhidrină 0,1–0,2% şi din nou se usucă în termostat la temperatura de 100°C. Pe cromatogramă apar unele pete galbene sau violete localizate la diferite distanţe de linia de start. Cu ajutorul riglei se măsoară următoarele distanţe:

1. De la linia de start pînă la centrul fiecărei pete (a);

2. De la linia de start pînă la hotarul solventului (b). Raportul dintre distanţele parcurse de aminoacid (a) şi de solvent (b) poartă denumirea de *coeficient de repartiţie* (R), specific pentru fiecare aminoacid în condiţii standard.

Importanţa clinico-diagnostică. Metoda permite determinarea calitativă şi cantitativă a aminoacizilor în obiectele biologice ceea ce are o importanţă deosebită în studierea metabolismului proteic. În diferite afecţiuni ale ficatului, rinichilor şi altor organe se constată modificarea conţinutului aminoacizilor în serul sanguin.

Experienţa 2. ***Reacţia biuretică (Piotrovschi).***

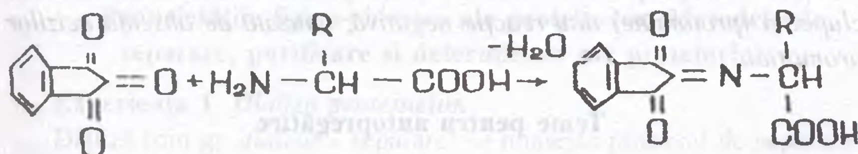
Principiul metodei. Legăturile peptidice (-NH-CO-) ale proteinelor în mediu alcalin reacţionează cu $CuSO_4$ formînd compuşi complecşi coloraţi în roşu-violet.

Mod de lucru. La 5 picături soluţie de ovalbumină de 1% se adaugă 5 picături soluţie de NaOH de 10% şi 2 picături soluţie de $CuSO_4$ de 1%. Eprubeta se agită. Apare culoarea violetă.

Notă: *la concentraţii majore în soluţie ale histidinei, serinei, treoninei, asparaginei reacţia biuretică este pozitivă. Ceilalţi aminoacizi dau reacţie negativă.*

Experienţa 3. ***Reacţia cu ninhidrină.***

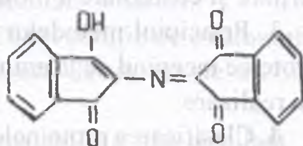
Principiul metodei. Ninhidrina reacţionează cu grupările α-amino ale proteinelor şi aminoacizilor cu formarea unui compus colorat în albastru-violet. Schema reacţiei:



Ninhidrină

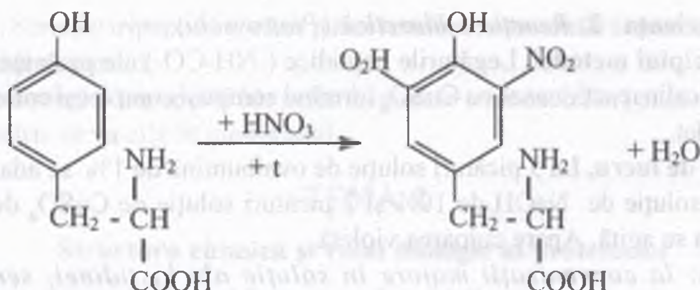
Ca rezultat al reacţiilor de transpoziţie, decarboxilare, scindare şi condensare a produsului de reacţie se obţine un compus complex colorat în albastru-violet.

Mod de lucru. La 5 picături de soluţie de proteină se adaugă 5 picături soluţie ninhidrină de 0,5%. Conţinutul eprubetei se fierbe 1–2 minute. Apare o culoare roz-violetă, care trece apoi în albastră.



Experienţa 4. ***Reacţia xantoproteică (Mulder).***

Principiul metodei. Aminoacizii aromatici la fierbere cu HNO_3 concentrat se supun nitrării. Ca rezultat soluţia capătă o culoare galbenă care trece în oranj la adăugarea bazei. Schema reacţiei:



Mod de lucru. La 5 picături soluție de ovalbumină se adaugă 3 picături de HNO_3 concentrat. În urma fierberii, conținutul eprubetei se colorează în galben. Dacă după răcire în eprubetă adăugăm 10–15 picături soluție de NaOH de 20%, culoarea soluției devine oranj ca rezultat al obținerii sării de sodiu a dinitrotirozinei.

Notă: *reacție pozitivă dau compușii fenolici. Gelatina, salmina, clupeina (protamine) dau reacție negativă, cauzată de absența acizilor aromatici.*

Teme pentru autopregătire

1. Nivelurile de organizare a moleculei proteice: structura primară, secundară, terțiară și cuaternară. Legăturile specifice acestor structuri. Foldingul și refoldingul proteinelor. Peptidele active.
2. Principiul metodelor de descifrare a structurii primare, secundare, terțiare și cuaternare a moleculei proteice.
3. Principiul metodelor de descifrare a structurii primare a moleculei proteice începînd de la aminoacidul: a) N-terminal; b) C-terminal și modul de realizare.
4. Clasificarea proteinelor.
5. Proteinele simple, proprietățile, particularitățile structurale.
6. Colagenul: particularitățile componenței aminoacidice și structurale.
7. Proteinele conjugate: nucleoproteidele, fosfoproteidele, lipoproteidele ș.a. Caracteristica generală.
8. Proteinele fixatoare de Ca^{2+}.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Care din aminoacizi participă la formarea legăturilor covalente în autostructurarea gradului trei de organizare a moleculei proteice (structurii terţiare)?

2. Cu care din metodele analitice folosite la lucrările de laborator se poate descifra componenţa aminoacidă a proteinei? (Trebuie să se ţină cont de faptul că proteina pură trebuie obţinută în prealabil şi că metoda este folosită pentru prima oară).

3. Principiul chimic al metodelor de descifrare a structurii primare a proteinelor începînd: a) de la aminoacidul N-terminal; b) de la aminoacidul C-terminal; c) prin hidroliza prealabilă a proteinei şi determinarea succesiunii fragmentelor polipeptidice în molecula proteică şi al aminoacizilor în lanţuri.

TEMA 3

Proprietăţile fizico-chimice ale proteinelor. Metodele de separare, purificare şi determinare ale proteinelor

Experienţa 1. ***Dializa proteinelor.***

Dializă (din gr. *dialisis* - separare) se numeşte procesul de separare a substanţelor macromoleculare şi soluţiilor coloidale de substanţe micromoleculare cu ajutorul membranelor semipermeabile (celofan, pergament, colodiu ş.a.). Din cauza diametrului mare, moleculele proteice, coloizii, substanţele macromoleculare nu pot trece prin porii acestor membrane, spre deosebire de substanţele micromoleculare şi săruri.

Mod de lucru. 1. Într-un balon se toarnă 20 ml soluţie de ovalbumină la care se adaugă 20 picături soluţie saturată de sulfat de amoniu $(NH_4)_2SO_4$.

2. Dintr-o foiţă de celofan umezită în prealabil cu apă distilată, se confecţionează un săculeţ în care se toarnă conţinutul balonului. Săculeţul se introduce într-un pahar cu apă distilată şi se cufundă astfel ca nivelul de lichid în săculeţ să fie mai jos de nivelul apei în pahar.

3. Peste o oră de la începutul dializei, în două eprubete se iau cîte 1 ml de lichid din pahar şi se efectuează următoarele reacţii: a) în una din eprubete se identifică prezenţa ionului de sulfat adăugînd 3–4 picături de soluţie de $BaCl_2$ de 5% (dacă reacţia este pozitivă, se observă apariţia precipitatului

de $BaSO_4$ sub formă de tulbureală de culoare albă); b) în a doua eprubetă se controlează prezenţa proteinei prin reacţia biuretică.

4. Soluţia din săculeţ se toarnă într-o eprubetă şi se verifică conţinutul ei prin reacţia biuretică. Ne convingem că prin membranele semipermeabile trec substanţele micromoleculare $(NH_4)_2SO_4$ şi nu pot trece proteinele. Dovadă servesc reacţia pozitivă cu $BaCl_2$ în prima eprubetă şi reacţia negativă biuretică.

Experienţa 2. ***Sedimentarea proteinelor.***

Denaturarea proteinelor (precipitarea ireversibilă) se reduce la distrugerea structurii moleculei proteice (în afară de structura primară), însoţită şi de pierderea proprietăţilor biologice. La sedimentarea ireversibilă proteinele suferă modificări profunde şi nu pot fi solubilizate din nou. Din reacţiile de sedimentare ireversibile ale proteinelor fac parte: precipitarea proteinelor cu sărurile metalelor grele, acizi minerali şi organici, reactivele alcaloide, precipitarea prin fierbere.

a. *Precipitarea proteinelor cu sărurile metalelor grele.*

Precipitarea proteinelor cu sărurile metalelor grele, spre deosebire de salifiere, are loc la concentraţii mici. În reacţie cu sărurile metalelor grele (Pb, Cu, Ag, Hg şi al.) proteinele absorb aceste metale, formînd compuşi complecşi sau substanţe saliforme, care nu se mai solubilizează în prezenţa excesului acestor săruri (cu excepţia $AgKO_3$ şi $HgCl_2$), dar se dizolvă în apă. Solubilizarea precipitatului proteic în exces de sare poartă denumirea de *peptizare adsorbtivă.* Acest fenomen se datorează apariţiei sarcinii electrice pozitive în moleculele proteice. Capacitatea proteinelor de a lega trainic ionii metalelor grele sub formă de precipitate insolubile se foloseşte în practica medicală ca antidot în caz de intoxicaţie cu sărurile de mercur, cupru, plumb ş.a. De obicei, imediat după intoxicaţie, pînă cînd sărurile n-au reuşit să se absoarbă, bolnavului i se administrează soluţie proteică şi se provoacă evacuarea (vomitarea) cu scopul de a înlătura toxina din organism.

Mod de lucru. În trei eprubete luăm cîte 5 picături de soluţie de ovalbumină. În prima adăugăm 1–2 picături soluţie de $CuSO_4$; în a două – 2 picături de soluţie de acetat de plumb; în a treia – 1–2 picături de soluţie de nitrat de argint. În toate eprubetele apare un precipitat, care nu se dizolvă în apă. Dacă în prima eprubetă mai adăugăm 5–10 picături de soluţie de sulfat de cupru, precipitatul se dizolvă. La adăugarea în eprubeta a treia a 5–10 picături de soluţie de nitrat de argint precipitatul nu se solubilizează.

b. *Precipitarea proteinelor cu acizi minerali.*

Acizii minerali concentraţi, cu excepţia acidului ortofosforic, provoacă denaturarea proteinelor cu formarea de săruri complexe.

Mod de lucru. În două eprubete luăm cîte 10 picături de acizi concentraţi - azotic şi sulfuric. *Înclinînd eprubetele la 45°, se toarnă pe* pereţii lor un volum egal de soluţie proteică, evitînd amestecarea lichidelor. La hotarul de separare a lichidelor apare un precipitat alb amorf în formă de inel. La adăugarea unui exces de acid în eprubetele respective observăm că precipitatul se dizolvă în acid sulfuric şi nu se dizolvă în acid azotic.

Experienţa 3. ***Separarea albuminelor şi globulinelor din ovalbumină.***

Proteinele din soluţii pot fi precipitate prin salifiere (cu soluţii de săruri neutre aşa ca sulfatul de amoniu, clorura de sodiu ş.a.). Salifierea este un proces reversibil. Mecanismul precipitării proteinelor din soluţii prin salifiere se reduce la deshidratarea macromoleculelor proteice şi înlăturarea sarcinii electrice. Asupra vitezei de precipitare a proteinelor prin salifiere acţionează un şir de factori aşa ca hidrofilitatea proteinei, masa moleculară, sarcina electrică, de aceea salifierea diferitelor proteine are loc în concentraţii diferite de săruri. De exemplu, albuminele se precipită în soluţie saturată de sulfat de amoniu, iar globulinele – în soluţie semisaturată de aceiaşi sare.

Mod de lucru. La 20 picături de soluţie de ovalbumină nediluată se adaugă 20 picături de soluţie saturată de sulfat de amoniu. Se obţine o soluţie semisaturată de sulfat de amoniu în care se precipită globulinele din ovalbumină. După 5 minute conţinutul eprubetei se filtrează (hîrtia de filtru se umezeşte în prealabil cu apă distilată). Pe filtru se reţine precipitatul de globuline, iar în filtrat trec albuminele. Pentru salifierea albuminelor, la filtrat se adaugă cristale de sulfat de amoniu pînă la saturaţie (pînă ce rata de sulfat de amoniu nu se dizolvă). Precipitatul apărut de albumine se filtrează, iar filtratul se verifică cu reacţie biuretică. Reacţia biuretică negativă indică lipsa proteinelor.

Experienţa 4. ***Separarea proteinelor prin metoda electroforetică pe hîrtie.***

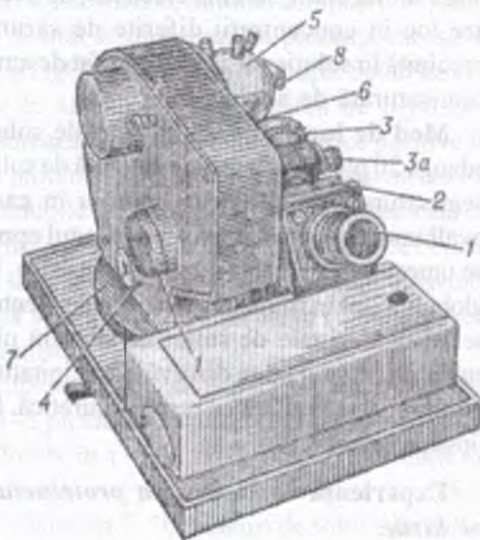
Principiul metodei. Direcţia migrării proteinelor în cîmpul electric depinde de pH-ul mediului şi proteinele, fiind electroliţi amfoteri, în mediul acid posedă

sarcină pozitivă şi se mişcă spre catod, în mediul bazic sunt încărcate negativ şi migrează spre anod. Separarea proteinelor din serul sanguin se efectuează folosind soluţie tampon de pH-ul 8,6 -8,9. În cîmpul electric continuu proteinele serului sanguin, posedînd sarcina electrică negativă la acest pH, migrează pe hîrtia umectată de soluţia tampon spre anod cu o viteză care depinde de mărimea sarcinii electrice şi de masa moleculară a particulelor. Mai repede migrează fracţia de albumine, apoi globulinele, care se separă în fracţii: α_1, α_2; β şi în final γ-globulinele.

Prin metoda electroforetică pe hîrtie proteinele serului sanguin se separă în 5-9 fracţii care pot fi evaluate procentual.

Mod de lucru. Pe linia de start a unei fişii de hîrtie de electroforeză se aplică proba de ser sanguin cercetat. Linia de start se află aproape de catod, deoarece folosim soluţie tampon cu pH-ul bazic în care proteinele manifestă sarcină negativă şi se vor mişca spre anod. Timpul de expunere se apreciază experimental (fracţiile proteice trebuie să se separe, dar să nu dispară de pe hîrtia de electroforeză, trecînd în soluţie tampon). Fracţiile proteice de pe electroforegramă se fixează prin uscare şi după aceea se "developează" (colorează) folosind un colorant specific pentru proteine.

Pentru a determina conţinutul procentual al fracţiunilor separate, electroforegrama se examinează prin densitometria sau colorimetria fiecărei fracţiuni. Suma extinţiei tuturor fracţiilor se va considera ca 100%, iar extinţia fiecărei fracţiuni va indica conţinutul de proteine.



Refractometrul IRF-22.

Experienţa 5. ***Determinarea concentraţiei de proteină totală în plasma (serul) sanguină prin metoda refractometrică.***

Principiul metodei. Metoda refractometrică se bazează pe capacitatea diferitelor medii de a reflecta în mod diferit razele de lumină ce le străbat. Raportul dintre sinusul unghiului de incidență (sin α) al razei și sinusul unghiului de refracție (sin β) poartă denumirea de *indice de refracție*:

$$N = \sin\alpha / \sin\beta$$

Indicele de refracție al soluției depinde de cantitatea, mărimea și structura fizică a particulelor dizolvate, precum și de temperatura mediului. În serul sanguin indicele de refracție depinde în primul rînd de cantitatea și calitatea proteinelor, sărurilor și a altor componente.

Indicele de refracție se determină cu ajutorul unui aparat special – refractometru – reprezentat în imaginea de mai sus.

Mod de lucru. Pe prisma de jos a camerei (5) refractometrului se aplică 2-3 picături de plasmă sau ser care se acoperă cu prisma de sus. Între prisme se formează un strat de soluție proteică. Cu ajutorul oglinzii, îndreptăm raza de lumină în ghișeul camerei. Uitîndu-ne în ocular (1) și folosind maneta (3), înlăturăm culorile spectrului la linia de separare a cîmpului optic în 2 câmpuri: unul luminat și altul întunecat. Cu maneta (7) instalăm punctul de încrucișare a liniilor care se observă în cîmpul optic la linia de separare a cîmpului. Indicele de refracție se citește după scara din partea stîngă a cîmpului.

Notă: Sensibilitatea metodei este de 0,5-1,0%, iar eroarea în limita de 10%.

Importanța clinico-diagnostică a metodei. Micșorarea conținutului de proteine totale serice (hipoproteinemie) se observă în inaniție proteică, tulburarea funcției protein-sintetice a ficatului, în urma pierderii proteinelor în hemoragii, exsudate masive în cavitățile seroase, în tulburarea filtrului renal (nefroze, amiloidoze).

Creșterea conținutului de proteină (hiperproteinemia) se observă comparativ rar – în boala mielomatoasă, macroglobulinemie (ca rezultat al sintezei proteinelor patologice – paraproteine), în excitația sistemului reticuloendotelial, în infecții și intoxicații. Hiperproteinemia relativă se observă în hemoconcentrație ca urmare a pierderii apei (diaree, sudorație intensă, poliurie, combustii).

Indicele de refracţie	Concentraţia proteinei în ser, %	Indicele de refracţie	Concentraţia proteinei în ser, %
1,33705	0,63	1,34575	3,68
1,33743	0,86	1.34612	5,90
1,33781	1,08	1,34650	6,12
1,33820	1,30	1,34687	6,34
1,33858	1,52	1,34724	6,55
1,33896	1,74	1,34761	6,77
1,33934	1,96	1,34798	6,98
1,33972	2,18	1,34836	7,20
1,34000	2,40	1,34873	7,42
1,34048	2,62	1,34910	7,63
1,34086	2,84	1,34947	7,85
1,34124	3,06	1,34984	8,06
1,34162	3,28	1,35021	8,28
1,34199	3,50	1,35058	8,49
1,34237	3,72	1,35095	8,71
1,34275	3,94	1,35132	8,92
1,34313	4,16	1,35169	9,14
1,34350	4,38	1,35205	9,35
1,34388	4,60	1,35242	9,57
1,34426	4,81	1,35279	9,78
1,34463	5,03	1,35316	9,99
1,34500	5,25	1,35352	10,20
1,34537	5,47	1,35388	10,41

Experienţa 6. ***Determinarea absorbanţei soluţiei proteice.***

Principiul metodei. Soluţiile proteice posedă absorbanţă în limitele spectrului ultraviolet, determinată de prezenţa resturilor aminoacizilor fenilalanina, tirozina şi triptofan. Fenilalanina şi tirozina au absorbanţa maximă la lungimea de undă 280 nm, iar triptofanul - 254 nm. Gradul de absorbanţă la lungimile de undă indicate este direct proporţional conţinutului de fenilalanină, tirozină şi triptofan în molecula proteinei.

Mod de lucru. E t a p a 1. Pentru analiză se foloseşte soluţia fracţiunii globulinice a ovalbuminei, căpătată după sedimentarea albuminelor în experienţa 3 de la tema 3 şi purificată de sulfat de amoniu prin dializă în experienţa 1 de la aceiaşi temă.

Soluţia dată se toarnă în cuva de 1 cm şi se fac măsurări la spectrofotometrul automat Specord UV-vis în zona ultravioletă a spectrului (180-340 nm). După graficul obţinut se determină unităţile densităţii optice D (absorbţiei luminei) a soluţiei cercetate de globulină corespunzătoare lungimilor de undă de 254 şi 280 nm şi se compară datele obţinute. În baza rezultatelor înregistrate se trag concluzii despre raportul fenilalaninei, tirozinei şi triptofanului în globulinele din ovalbumină.

E t a p a 2. Se determină cantitatea de fenilalanină, tirozină şi triptofan cu ajutorul reacţiei Pauli şi Adamkiewick-Hopkins, cum a fost descris în experienţele 4 şi 5 (tema 1). După apariţia în timpul reacţiilor date a coloraţiei specifice probele se colorimetrează. Concentraţia aminoacizilor fenilalanina, tirozina şi triptofanul se determină după graficul de calibrare.

Se determina raportul dintre concentraţiile de fenilalanină, tirozină şi triptofan. Raportul obţinut se compară cu raportul absorbţiei de la etapa 1.

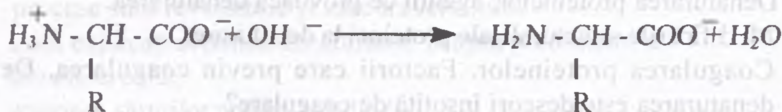
Experienţa 7. ***Determinarea punctului izoelectric.***

Principiul metodei. Sarcina electrică a unei proteine în soluţie este determinată de numărul şi gradul de disociere al grupărilor acide sau bazice ale aminoacizilor din componenţa ei. În funcţie de pH-ul mediului, aminoacizii se comportă ca acizi sau ca baze. În funcţie de mediu, au loc următoarele reacţii:

- în mediu acid:



- în mediu alcalin:



Astfel la trecerea curentului electric prin soluţie, aminoacizii vor migra în mediu acid spre catod, iar în mediu alcalin – spre anod. La o anumită valoare a pH-ului, migrarea în cîmpul electric nu are loc, aminoacidul găsindu-se sub

formă de dipol. În această stare se exercită forţe de atracţie reciprocă între grupările – COO^- şi - NH_3^+. Are loc o aglomerare a moleculelor din soluţie şi solubilitatea devine minimă. Valoarea pHi-ului la care migrarea proteinelor sau a aminoacizilor într-un cîmp electric este nulă, poartă denumirea de *punct izoelectric* (pHi). El are valori diferite pentru fiecare aminoacid sau proteină.

Acizii monoaminomonocarboxilici au pHi-ul în jurul valorii 6, deoarece disocierea grupării - COOH este mai mare decît a grupării - NH_2.

Acizii monoaminodicarboxilici (acid aspartic şi glutamic) au pHi-ul în zonă acidă 3,0-3,2 datorită celor două grupări carboxilice, pe cînd cei diaminomonocarboxilici au pHi-ul situat în mediu alcalin.

Reactivele: Soluţie acetat de sodiu de 0,1 N; soluţie acid acetic de 0,1 N; soluţie gelatină de 1%; alcool metilic.

Mod de lucru. Se iau 6 eprubete şi în fiecare se adaugă următoarele soluţii după cum este arătat în tabelul de la p. 28.

După adăugarea alcoolului metilic, eprubetele se agită şi se lasă pentru o jumătate de oră. În eprubeta a 4-a apare o tulbureală intensă. Deci în această eprubetă s-a realizat pHi, care este de 4,7.

Teme pentru autopregătire

1. Proprietăţile fizico-chimice ale proteinelor: masa moleculară, solubilitatea, proprietăţile amfotere.
2. Proprietăţile hidrofile ale proteinelor în funcţie de particularităţile structurale şi aminoacizii constituienţi.
3. Factorii de stabilizare în soluţie a substanţelor coloidale.
4. Sarcina electrică a proteinelor. Punctul şi starea izoelectrică.
5. Denaturarea proteinelor, agenţii ce provoacă denaturarea. Modificările structurale ale proteinei la denaturare.
6. Coagularea proteinelor. Factorii care previn coagularea. De ce denaturarea este deseori însoţită de coagulare?
7. Starea soluţiilor coloidale: sol, gel, xerogel. Exemple.
8. Metodele de studiere a componenţei calitative şi cantitative a proteinelor: a) hidroliza; b) cromatografia; c) electroforeza; d) salifierea; e) dializa.

Reactivii care se adaugă (ml)	Numărul eprubetelor:					
	1	2	3	4	5	6
Acetat de sodiu de 0,1 N	2	2	2	2	2	1,2
Acid acetic de 0,1 N	0,25	0,5	1	2	4	4,8
Apă distilată	3,75	3,5	3	2	-	-
Gelatină	2	2	2	2	2	2
pHi-ul ce se obține	5,6	5,3	5,0	4,7	4,4	4,1
Alcool metilic	8	8	8	8	8	8
Tulbureală			++	+++		

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Aveți la dispoziție un șir de eprubete cu soluții coloidale. Cum se poate identifica în care din eprubete se conține proteină și în care alte substanțe coloidale?
2. Cum explicați faptul că într-un mediu puternic bazic sau acid proteinele se denaturează dar nu se precipită?
3. De ce unele produse infectate sau toxice pot fi folosite în alimentație după o expunere termică (fierbere), iar altele nu? Motivați răspunsul.
4. Proteina se precipită la adăugarea etanolului. Precipitatul maxim se observă în eprubeta cu pH-ul 9,1. Care aminoacizi predomină în componența proteinei?
5. Cum se poate separa din amestec proteina cu punctul izoelectric cunoscut avînd la dispoziție acizi, baze, săruri, etanol?
6. Ce transformări suferă molecula proteică la: a)hidroliză; b) salifiere; c) denaturare. Care niveluri de structură se modifică și care din aceste procese sunt reversibile și care ireversibile?
7. Cum explicați acțiunea denaturantă asupra proteinelor a:
a) alcoolului etilic;
b) acetonei, sărurilor neutre, iodului?
8. De ce punctul izoelectric al majorității proteinelor se găsește într-un mediu slab acid (pH = 4,5–6,0), iar a protaminelor și histonelor – în mediu slab alcalin?

9. Spre care electrod vor migra histonele (linia de start se află la mijlocul benzei electroforetice) cînd vom folosi soluţiile tampon cu: a) pH = 4,0 b) pH = 9,0? Motivaţi răspunsul.
10. Cum putem trece soluţia coloidală din gel în sol şi invers? Motivaţi răspunsul.
11. Ce numim xerogel? Enumeraţi exemple de xerogel.
12. Principiul metodei de secare liofilă a soluţiilor coloidale; utilizarea acestei metode în industria medicală şi economia naţională. Prioritatea acestei metode la prepararea medicamentelor de origine proteică.
13. Cu ajutorul căror metode este posibilă separarea soluţiilor proteice de substanţele micromoleculare? Care din aceste metode au fost folosite la lucrările de laborator şi în ce constă principiul lor?
14. Calculaţi masa moleculară a proteinei dacă se ştie că ea conţine 0,34% fier cu masa atomică de 56,0.
15. Calculaţi masa moleculară a proteinei care conţine 0,6% triptofan cu masa moleculară de 204.
16. Argumentaţi biologic şi biochimic prelucrarea cîmpului pentru operaţii şi injecţii cu alcool etilic, soluţie de iod.
17. Argumentaţi utilizarea proteinelor laptelui şi ouălor în intoxicaţiile cu săruri ale metalelor grele.

Partea a II-a. Enzimele

Enzimele (sau fermenţii) sunt catalizatori biologici de natură proteică care în anumite condiţii accelerează reacţiile chimice atît în ţesuturile organismului, cît şi în exteriorul lui.

După structura chimică, enzimele sunt proteine simple sau conjugate. Enzimele - proteine simple se mai numesc monocomponente. Din această grupă fac parte hidrolazele: pepsina, tripsina, lipaza, amilaza, zaharaza ş. a.

Enzimele - proteine conjugate, mai poartă denumirea de bicomponente, deoarece constau din două componente: partea proteică - *apoenzimă* şi partea neproteică - *coenzimă*. Multe coenzime (TDP, NAD, FAD, CoA şi al.) sunt derivaţi ai vitaminelor. Coenzime pot fi şi unii ioni metalici (Ca, Zn, Mn, Mo ş. a.).

La interacţiunea cu substratul nu participă întreaga moleculă de enzimă, ci numai un anumit sector al ei - *centrul activ*. El asigură contactul şi transformările ulterioare ale substratului şi este format din diferite grupări funcţionale: OH, SH, inelul imidazolic ş. a. În componenţa centrului activ al enzimelor bicomponente pot intra şi coenzimele, ionii metalelor.

Multe enzime pe lîngă centrul activ, posedă şi *centrul alosteric* sau *centrul de reglare*. Substanţele care se combină cu centrul alosteric al enzimei şi modifică activitatea ei poartă denumirea de *efectori alosterici* (inhibitori sau activatori). Sub acţiunea efectorilor se modifică configuraţia moleculei de enzimă şi simultan conformaţia centrului activ, care la rîndul său posedă proprietatea de a reacţiona cu substratul. Deci efectorii alosterici realizează reglarea metabolismului.

Actualmente sunt cunoscute circa 2000 de enzime. Conform clasificării unice mondiale, enzimele se împart în şase clase: oxidoreductaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze şi ligaze sau sintetaze. Denumirea claselor provine de la tipul reacţiilor catalizate de enzimele corespunzătoare. Fiecare enzimă este numerotată printr-un cod constituit din patru cifre, separate prin punct şi dispuse conform următoarelor principii: prima cifră indică clasa, a doua - subclasa, a treia - subsubclasa, a patra - numărul de serie al enzimei în subsubclasă. De exemplu, succinatdehidrogenaza prezintă numărul de cod EC 1.3.99.1., aspartataminotransferaza - EC 2.6.6.1.1, lipaza - EC 3.1.1.3.

Unele enzime au cîteva forme moleculare, formînd aşa-numitele izoenzime sau izozime. Izozimele posedă o specificitate identică, dar se deosebesc după proprietăţile fizico-chimice şi imunologice ca rezultat al unei deosebiri în componenţa aminoacidică a apoenzimei. Izoforme au astfel de enzime ca lactatdehidrogenaza, malatdehidrogenaza, creatinkinaza ş. a., în total circa 100 de enzime. Raportul dintre formele de izozime în ţesuturi depinde de vîrstă, starea fiziologică a organismului ş. a.

Enzimele, în calitate de catalizatori biologici, posedă anumite proprietăţi şi anume: a) activitate catalitică mare; b) specificitate; c) termolabilitate; d) dependenţa activităţii enzimei de pH; e) modificarea activităţii în prezenţa activatorilor şi inhibitorilor. Proprietăţile enzimelor enumerate mai sus indică natura proteică a enzimelor.

Întrucât în ţesuturi şi lichidele biologice ale organismului enzimele se conţin în concentraţii mici determinarea lor este dificilă. Pentru evidenţierea lor sunt folosite de obicei metode indirecte. Prezenţa şi activitatea enzimei se apreciază după acţiunea efectuată de enzimă, adică după concentraţia produselor de reacţie. Prezenţa şi activitatea lipazei se apreciază după cantitatea de acizi graşi liberi obţinuţi ca rezultat al scindării grăsimilor; a amilazei (sanguine, urinare) - după cantitatea de amidon scindată într-o anumită perioadă de timp.

Viteza reacţiei enzimatice depinde de raportul dintre concentraţiile enzimei şi substratului. În condiţii normale, în mediul extracelular, sînge, lichide biologice enzimele se conţin în cantităţi mici.

În diferite stări patologice, în urma lezării organelor şi celulelor, conţinutul intracelular ajunge în sînge şi alte lichide biologice provocînd creşterea conţinutului de enzime. Modificarea activităţii enzimatice din sînge şi alte lichide biologice serveşte ca indicator important în diagnosticul bolilor şi se foloseşte pe larg în medicina practică.

TEMA 4

Natura chimică şi structura enzimelor. Mecanismul acţiunii enzimatice. Clasificarea enzimelor. Vitaminele în calitate de coenzime

Experienţa 1. ***Demonstrarea prezenţei legăturilor peptidice în molecula enzimei tripsina.***

Se realizează prin intermediul reacţiei biuretice. Principiul metodei şi mersul lucrării este descris în lucrarea practică 2, experienţa 2.

Experienţa 2. ***Demonstrarea prezenţei aminoacizilor în molecula enzimei tripsina.***

Se efectuează prin intermediul reacţiilor ninhidrinice, xantoproteice şi reacţiei Fol. Principiul metodei şi mersul lucrării sunt descrise în lucrarea practică 1, experienţa 1 şi în lucrarea practică 2, experienţa 3 şi 4.

Experienţa 3. ***Identificarea vitaminei B_1 cu ajutorul diazoreacţiei.***

Vitamina B_1 conţine inelul pirimidinic şi tiazolic şi este numită tiamină, deoarece conţine sulf şi gruparea amino. Dacă hidrogenul din grupa alcoolică primară este substituit cu restul de pirofosfat (difosfat), atunci se obţine tiaminpirofosfat (TPP) sau tiamindifosfat (TDP) care servesc drept coenzimă. Această coenzimă se sintetizează în ficat în urma transferului restului de pirofosfat (difosfat) de la ATP, în alte ţesuturi de la TTP. TPP (TDP) participă la reacţiile de decarboxilare a α-cetoacizilor şi în reacţia transcetolazică fiind partea structurală a enzimelor care participă la metabolismul glucidelor.

Carenţa de vitamină B_1 în alimente provoacă dereglări ale sistemului nervos periferic cunoscute sub denumirea de beri-beri sau polinevrită. În acest caz în organism creşte concentraţia de acid piruvic şi alţi α-cetoacizi.

Principiul metodei. Tiamina în mediu alcalin formează cu diazoreactivul un compus complex de culoare oranj.

Mod de lucru. La 5 picături de diazoreactiv, care constă din volume egale de soluţie de acid sulfanilic de 1% şi soluţie de nitrit de sodiu de 5%, se adaugă 1–2 picături soluţie de tiamina de 5%. Înclinînd eprubetă se picură atent pe pereţii ei 5–7 picături de bicarbonat de sodiu de 10%. La hotarul dintre lichide apare un inel colorat în oranj.

Experienţa 4. ***Identificarea vitaminei B_2.***

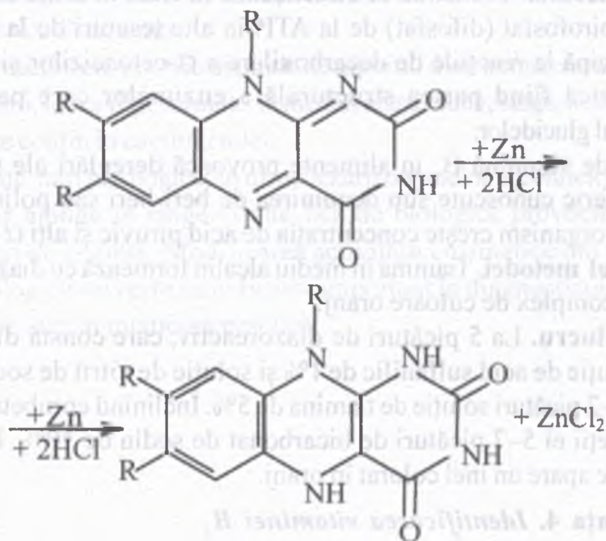
Vitamina B_2, sau riboflavina, constă din inelul izoaloxazinic şi polialcoolul ribitol. Ea este partea componentă a grupării prostetice a enzimelor flavinice (flavoproteinelor), partcipînd la sinteza flavinadenindinucleotidului (FAD) şi flavinmononucleotidului (FMN). Flavoproteinele participă la reacţiile de dehidrogenare (scindarea protonilor şi electronilor de la anumite substrate - substanţe care se oxidează şi servesc ca donatori de hidrogen). Aceste enzime participă la oxidarea D-aminoacizilor, acizilor graşi, NADH, în oxidarea biologică ş. a.

Acţiunea biologică a enzimelor flavinice depinde de prezenţa legăturilor duble în inelul izoaloxazinic: flavinenzima rupe de la molecula care se oxidează doi electroni şi doi protoni, unindu-i la atomii de azot legaţi prin legături duble.

În carenţa de vitamină B_2 poate apărea cataracta (tulburarea cristalinului) şi alte dereglări.

Principiul metodei. Forma oxidată a vitaminei B_2 reprezintă o substanţă care la iradiere cu raze ultraviolete dă o fluorescenţă de culoare galbenă. Reacţia de identificare a vitaminei B_2 este bazată pe proprietatea ei de a se reduce uşor. În formă oxidată vitamina B_2 are o culoare galbenă, iar la începutul reacţiei de reducere dă o culoare roză (se obţin derivaţi intermediari) care în cele din urmă se decolorează, deoarece forma redusă a vitaminei B_2 este incoloră.

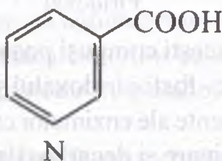
Reacţia decurge conform schemei:



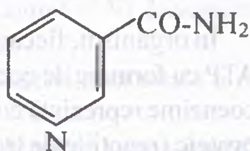
Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 10 picături de soluție de vitamină B_2, se adaugă 5 picături de acid clorhidric concentrat și o granulă de zinc metalic. Se observă degajarea bulelor de hidrogen, lichidul galben se colorează treptat în roz, după ce se decolorează.

Experiența 5. ***Identificarea vitaminei PP.***

Vitamina PP (din ital. *pelagre* – preventive) este un derivat al inelului piridinic. Activitate antipelagroasă, în afară de acidul nicotinic, posedă și amida lui.



Vitamina PP



Amida vitaminei PP

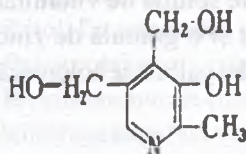
În organismul uman și animal, vitamina PP se află în forma conjugată cu proteinele. Din vitamina PP se obțin două coenzime - nicotinamidadenindinucleotida (NAD) și nicotinamidadenindinucleotidfosfat (NADP). Acestea sunt coenzime ale dehidrogenazelor care participă la multiple reacții de oxido-reducere. NAD^+ și $NADP^+$ adiționează electroni și protoni de la substratele care se oxidează. Electronii și protonii, adiționându-se la NAD+ și NADP+, reduc inelul piridinic.

Carența de vitamină PP în alimente provoacă boala pelagra.

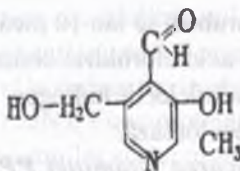
Principiul metodei și modul de lucru. Într-o eprubetă se iau 20 picături de soluție de vitamină PP se agită și se încălzește pînă la fierbere; ca rezultat dispare tulbureala și soluția devine transparentă. Se agită soluția de acetat de cupru de 5% și se adaugă 20 picături la soluție fierbinte de vitamină PP. Eprubeta se încălzește din nou pînă la fierbere și după aceea se răcește într-un jet de apă rece. La fundul eprubetei se depune un precipitat de culoare albastră de sare de cupru a acidului nicotinic.

Experiența 6. ***Identificarea vitaminei*** B_6.

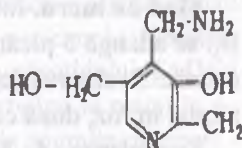
Din grupul vitaminei B_6 fac parte piridoxolul, piridoxal și piridoxamina, derivați ai piridinei care poartă denumirea generală de piridoxină. Aceste trei substanțe posedă activitate de vitamină B_6.



Piridoxol



Piridoxal



Piridoxamină

În organism, fiecare din aceşti compuşi poate fi fosforilat cu participarea ATP cu formare de coenzime - fosfopiridoxalul şi fosfopiridoxamina. Aceste coenzime reprezintă componente ale enzimelor care participă la metabolismul proteic (reacţiile de transaminare şi decarboxilare a aminoacizilor, reacţiile de desulfurare şi dehidratare a aminoacizilor, reacţiile de sinteză a vitaminei PP din triptofan ş. a.)

În carenţa de vitamină B_6 în alimente, la animale se observă tulburarea metabolismului proteic; la oameni carenţa de vitamină B_6 se observă rar.

Principiul metodei. Vitamina B_6, reacţionînd cu clorura de fier, formează o sare complexă de tipul fenolatului de fier de culoare roşie.

Mod de lucru. La 5 picături soluţie de vitamină B_6 de 1% se adaugă un volum egal soluţie de clorură de fier de 1%. Amestecul se agită. Apare o coloraţie roşie.

Teme pentru autopregătire

1. Noţiune despre enzime, natura chimică şi rolul biologic al enzimelor. Deosebirile dintre acţiunea enzimelor şi catalizatorilor nebiologici.

2. Dovezile naturii proteice a enzimelor. Structura enzimelor. Proenzimele (zimogenii). Noţiune despre centrul activ şi centrul alosteric al enzimelor.

3. Izoenzimele şi rolul lor.

4. Cofactorii enzimelor. Coenzimele şi ionii metalici. Funcţiile de coenzime ale vitaminelor şi microelementelor.

5. Natura chimică (structura) a vitaminelor B_1, B_2, B_6, PP CoA, biotina, acidul folic şi rolul lor ca coenzime.

6. Mecanismul de acţiune al enzimelor. Centrul activ al enzimelor şi rolul lui în formarea şi transformarea complecşilor intermediari dintre enzimă şi substrat. Rolul modificărilor conformaţionale reciproce ale moleculei enzimei şi substratului la favorizarea catalizei (reacţiei).

7. Nomenclatura (denumirea) şi clasificarea enzimelor. Caracteristica generală a claselor şi subclaselor principale de enzime. Numărul de cod al enzimei.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Prin care experienţă şi pe exemplul cărei enzime a fost demonstrată la lucrările de laborator: a) natura proteică a enzimelor; b) deosebirea în acţiunea enzimelor şi catalizatorilor nebiologici.
2. Care este rolul vitaminelor în metabolism şi activitatea vitală a organismelor?
3. Ce modificări metabolice ilustrează stările de hipo- şi avitaminoze?
4. Centrele active pot fi separate din enzime? Motivaţi răspunsul.
5. Care-s deosebirile în componenţa centrelor active ale enzimelor simple (monocomponente) şi a celor conjugate?
6. Toate enzimele posedă centre alosterice? Ce denumire mai poartă aceste enzime? Care este mecanismul lor de reglare?
7. Determinaţi clasa, subclasa şi subsubclasa următoarelor enzime: a) amilazei; b) pepsinei; c) lipazei.
8. Scrieţi nomenclatura (denumirea) claselor de enzime şi semnalaţi ordinea claselor conform Comisiei internaţionale pentru enzime din cadrul I.U.B. (EC).

TEMA 5

Influenţa factorilor de mediu asupra activităţii enzimatice. Determinarea activităţii enzimatice. Efectorii enzimatici

Experienţa 1. ***Inhibiţia competitivă (concurentă) a enzimelor (pe exemplul succinatdehidrogenazei).***

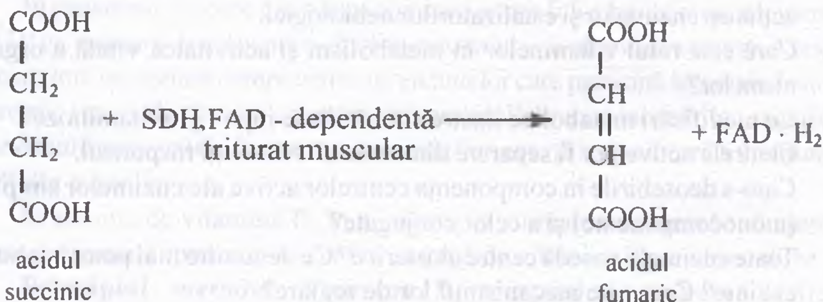
Principiul metodei. Succinatdehidrogenaza (SDH) (EC 1.3.99.2.) catalizează oxidarea (dehidrogenarea) acidului succinic şi transformarea lui în acid fumaric. FAD-ul serveşte ca coenzimă a SDH. După natura chimică această enzimă face parte din grupa metaloflavoproteidelor. Activitatea ei depinde de prezenţa în componenţa centrului activ a grupărilor sulfhidrile libere - SH şi a ionilor de Fe^{2+}.

Ca sursă de enzimă este folosit omogenatul ţesutului muscular spălat în prealabil, în care SDH este strîns legată ca componentă structurală a

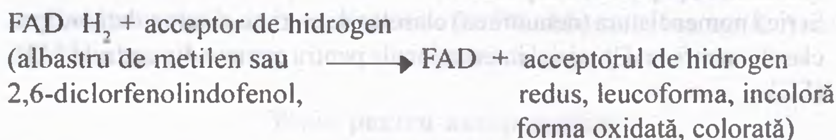
membranei interne a mitocondriilor celulare. Acțiunea enzimei se determină în condiții anaerobe prin adăugarea soluției de acid succinic ca substrat, albastrului de metilen sau 2,6-diclorfenol-indofenolului ca acceptori de hidrogen, care, reducîndu-se, se transformă în leucoformă incoloră.

Reacția decurge conform schemei:

Etapa I:



Etapa II:



Decolorarea amestecului (enzimă, substrat și acceptor) servește ca dovadă a activității SDH. Inhibitor competitiv al SDH este acidul malonic HOOC–CH_2–COOH, analogul structural al acidului succinic. Mecanismul de inhibiție se explică prin aceea, că centrul activ al SDH se combină mai activ cu acidul malonic conținut într-o concentrație mai mare, dar care nu se oxidează și simultan împiedică interacțiunea enzimei specifice cu substratul respectiv. De aceea, dacă în eprubeta, în care pe lîngă reactivii conținuți în eprubeta de experiență se adăugă acidul malonic, lichidul nu se decolorează (reacția de oxido-reducere este blocată, nu enzima).

Mod de lucru. Un gram de țesut muscular se mărunțește cu foarfecele și se triturează în mojar timp de 1 minut cu o cantitate mică de apă (2–3 ml). Trituratul muscular se transferă apoi pe un strat dublu

de tifon instalat pe pîlnie şi se spală cu 15–20 ml de apă. Tifonul cu triturat se stoarce, iar trituratul se transferă pe hîrtie de filtru şi se usucă. În 3 eprubete se măsoară cîte 3 ml de soluţie tampon fosfat (pH=7,4). În fiecare eprubetă se introduc aproximativ cîte 0,1 g de triturat muscular (uscat în prealabil pe hîrtie de filtru). După aceasta, în prima eprubetă (de experienţă) se adaugă 5 picături soluţie de acid succinic de 3% şi 5 picături soluţie de NaOH de 0,1 N (pentru neutralizare). În eprubeta a doua (de control) se adaugă 10 picături de apă distilată; în eprubeta a treia – 5 picături soluţie de acid succinic de 3%, 5 picături soluţie de acid malonic de 3% şi 5 picături soluţie de NaOH de 0,1 N. Apoi în toate eprubetele se adaugă cîte 1 ml soluţie de 2,6-diclorfenolindofenol de 0,001 N. Eprubetele se agită şi se introduc în termostat sau baia de apă la temperatura de 37°C pentru 40 de minute. După expirarea timpului, se observă că lichidul din prima eprubetă (de experienţă) se decolorează parţial. Se compară coloraţia primei eprubete cu eprubeta a doua (de control), în care se conţine numai enzimă, şi eprubeta a treia care conţine enzimă, substrat, inhibitorul şi acceptorul de hidrogen.

Trageţi concluzii referitor la rezultatele obţinute.

Experienţa 2. ***Studierea proprietăţilor generale ale enzimelor*** (*specificitatea, termolabilitatea*) ***pe exemplul succinatdehidrogenazei.***

Principiul metodei: Rămîne acelaşi ca şi în experienţa 1.

a) Specificitatea

Mod de lucru. În trei eprubete se introduc cîte 2 ml de homogenat muscular şi se adaugă: în I – 0,4 ml de apă distilată, în a II-a – 0,2 ml soluţie de malat de 1% şi 0,2 ml de apă distilată, în a III-a – 0,4 ml soluţie de malat de 1%. În toate trei eprubete se adaugă cîte 1 ml soluţie de acid succinic de 1%, 2-3 picături soluţie de albastru de metilen de 1% şi după agitare cîte 3-4 picături de ulei de vazelină conform tabelului.

Eprubetele se introduc în baia de apă la temperatura de 38°C. Peste 5-10 minute eprubetele se scot şi se observă schimbarea culorii.

Conţinutul eprubetelor	Numărul eprubetei		
	I	II	III
Homogenat muscular	2 ml	2 ml	2 ml
Apă distilată	1 ml	-	-
Soluţie de malat de 1%	-	-	1 ml
Soluţie de succinat de 1%	-	1 ml	-
Soluţie de albastru de metilen de 1%	3 picături	3 picături	3 picături
Ulei de vazelină	3 picături	3 picături	3 picături

Rezultatele experienţei se introduc în tabel şi se trag concluziile necesare.

Schimbarea culorii	Numărul eprubetei		
	I	II	III

b) Termolabilitatea succinatdehidrogenazei

Principiul metodei. Metoda se bazează pe reducerea ferocianurii de potasiu ($K_3[Fe(CN)_6]$), care are o culoare galbenă, pînă la ($K_4[Fe(CN)_6]$), care este incolor, de către succinat în prezenţa succinatdehidrogenazei. Activitatea enzimei este proporţională cu cantitatea de ferocianură redusă.

Reacţia are loc după următoarea schemă:



$$\text{Succinat} + 2[Fe(CN)_6]^{3-} \longrightarrow \text{fumarat} + 2H^+ + 2[Fe(CN)_6]^{4-}$$

Mod de lucru. În eprubete de centrifugat se introduc cîte 1 ml de soluţie tampon fosfat 0,1M pH 7,4 şi 0,1 ml de soluţii de acid succinic, EDTA, azotură de sodiu şi apă distilată. La probe se adaugă cîte 0,5 ml de suspensie de mitocondrii, obţinută din ţesutul cercetat, şi se lasă la temperatura camerei timp de 5 minute pentru inhibarea citocromoxidazei de către azidul de sodiu. Pentru declansarea reacţiei se adaugă 0,1 ml soluţie de ferocianură de potasiu. Probele se incubează 10-15 minute la temperatura de 10°, 20° 30°, 40° şi 50°C. După incubare, reacţia este stopată prin cufundarea probelor în gheaţă şi adăugarea a cîte 2 ml de acid tricloracetic de 20%. În probele de control, care conţin toate componentele amestecului de incubare, acidul tricloracetic se adaugă înaintea suspensiei de mitocondrii. Astfel, în probele de control succinatdehidrogenaza este complet denaturată din momentul

începerii incubării din care cauză reducerea specifică a ferocianurii de către succinat nu are loc.

După stoparea reacţiei şi răcire, probele se centrifughează la 2000 turaţii pe minut timp de 15 minute pentru sedimentarea completă a proteinelor mitocondriale denaturate. Probele se fotometrează la spectrofotometru (lungimea de undă 420 nm) contra probei de control.

Activitatea enzimei se determină conform curbei de calibrare.

În baza datelor obţinute se construieşte graficul de calibrare a dependenţei activităţii succinatdehidrogenazei de temperatură şi se trag concluzii.

Experienţa 3. ***Acţiunea pH-ului asupra activităţii succinatdehidrogenazei.***

Mod de lucru: În 3 eprubete de centrifugat se introduc cîte 1 ml soluţie tampon fosfat cu pH 5,5; pH 7,4 şi pH 9,18; 0,1 ml soluţii de acid succinic, EDTA, azid de sodiu şi apă distilată. La probe se adaugă cîte 0,5 ml de suspensie de mitocondrii, obţinută din ţesutul cercetat, şi probele se incubează la temperatura camerei timp de 5 minute pentru inhibarea citocromoxidazei cu azid de sodiu. Reacţia se declanşează prin adăugarea a 0,1 ml soluţie de ferocianură de potasiu. Probele se incubează 10-15 minute la temperatura de 37°C.

După incubare, reacţia este stopată prin cufundarea probelor în gheaţă şi adăugarea a cîte 2 ml acid tricloracetic de 20%. În probele de control, care conţin toate componentele amestecului de incubare, acidul tricloracetic se adaugă înaintea suspensiei de mitocondrii. În aşa fel, succinatdehidrogenaza în probele de control din momentul începerii incubării este complet denaturată şi reducerea specifică a ferocianurii de către succinat nu are loc.

După stoparea reacţiei şi răcire, probele se centrifughează la 2000 turaţii pe minut timp de 15 minute pentru sedimentarea completă a proteinelor mitocondriale denaturate. Probele se fotometrează la spectrofotometru (lungimea de undă 420 nm) contra probei de control.

Activitatea enzimei se determină conform curbei de calibrare.

În baza rezultatelor obţinute se construieşte graficul de calibrare a dependenţei activităţii succinatdehidrogenazei de pH-ul mediului.

Teme pentru autopregătire

1. Proprietăţile generale ale enzimelor (termolabilitatea, specificitatea), acţiunea pH-ului asupra activităţii enzimatice.

2. Activarea şi inhibarea enzimelor:

a) mecanismele de activare (proteoliza parţială, activarea alosterică, autostructurarea cuaternară, fosforilarea şi defosforilarea, reactivarea).

b) mecanismele de inhibiţie (specifică şi nespecifică, reversibilă şi ireversibilă, alosterică şi competitivă).

3. Organizarea enzimelor în celulă (ansamblurile enzimatice, compartimentalizarea). Reglarea activităţii enzimatice în celulă. Importanţa principiului de retroinhibiţie.

4. Deosebirile în componenţa enzimatică a organelor şi ţesuturilor. Enzimele organospecifice. Modificarea activităţii enzimatice în diferite afecţiuni (enzimodiagnosticul).

5. Metodele de obţinere şi purificare ale enzimelor. Cromatografia de afinitate.

6. Utilizarea enzimelor în practica medicală. Întrebuinţarea enzimelor imobilizate în medicină.

7. Unităţile de activitate ale enzimelor.

8. Metodele de determinare a activităţii enzimelor.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţie de problemă

1. Cum putem demonstra că specificitatea enzimelor este determinată de partea proteică (apoenzimă)? Exemplificaţi răspunsul.

2. Cum se explică varietatea spectrelor izoenzimatice ale diferitelor organe?

3. Numiţi căile şi tipurile de activare şi inhibare ale enzimelor.

4. Cu care experienţă şi pe exemplul cărei enzime a fost demonstrată la lucrările practice; a) acţiunea temperaturii şi pH-ului asupra activităţii enzimatice; b) specificitatea acţiunii enzimatice; c) inhibiţia competitivă (concurentă)? Principiul acestor lucrări, reacţiile şi metaboliţii, după care se apreciază acţiunea enzimelor.

5. Care din metodele de separare şi purificare ale enzimelor este mai rapidă, monoetapică şi mai economică? Denumirea şi principiul acestei metode.

6. În ce constă importanţa clinică a determinării activităţii enzimelor în lichidele biologice? În patologie are loc reducerea sau sporirea activităţii enzimelor? Motivaţi răspunsul.

7. În pancreas se sintetizează enzime care participă la procesul de digestie. Prin metoda de uscare liofilă şi triturare ulterioară se obţine preparatul pancreatina. Cum vom proceda pentru identificarea enzimelor care se conţin în acest preparat?

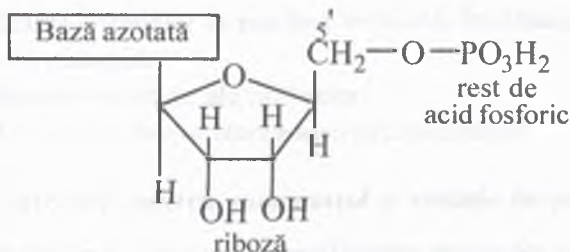
CAPITOLUL II

Nucleotidele. Structura şi biosinteza acizilor nucleici. Sinteza proteinelor şi reglarea ei. Biosinteza anticorpilor

Acizii nucleici sunt produşi de policondensare ale mononucleotidelor, deci sunt polinucleotide. Mononucleotidele, unităţile structurale fundamentale ale acizilor nucleici, sunt constituite din: a) o bază azotată purinică sau pirimidinică; b) o pentoză (riboza sau dezoxiriboza); c) rest de acid fosforic. Bazele purinice sau pirimidinice sunt legate covalent printr-o legătură - N-glicozidică cu atomul de carbon 1′ al pentozei. Compuşii rezultaţi se numesc nucleozide. Cele mai multe au fosfatul legat printr-o legătură esterică cu gruparea 5′-hidroxil din molecula pentozei.

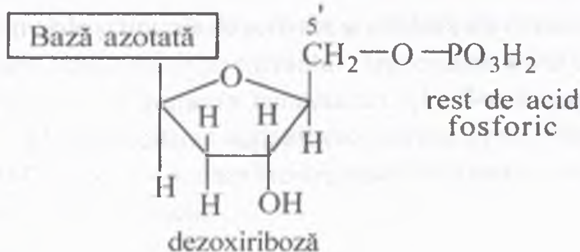
În funcţie de componentele structurale, deosebim: acizi ribonucleici (ARN), şi acid dezoxiribonucleic (ADN).

Ribonucleotidele, unităţile monomere ale ARN, conţin ca pirimidine citozina şi uracilul, ca purine – adenina şi guanina, iar ca pentoză – riboza. Structura generală a ribonucleotidelor se prezintă în felul următor:



riboză

Unităţile monomere ale ADN, dezoxiribonucleotidele, conţin ca pirimidine citozina şi timina, ca purine – adenina şi guanina. Pentoza este reprezentată de dezoxiriboză. Structura generală a dezoxiribonucleotidelor se prezintă astfel:



dezoxiriboză

Mononucleotidele se pot lega prin punţi fosfodiesterice între gruparea 5'-hidroxil a unui mononucleotid şi gruparea 3'- hidroxil a mononucleotidului învecinat. Astfel se formează lanţuri polinucleotidice macromoleculare. Prin legături macroergice mononucleotidele pot lega încă unul sau două resturi de acid fosforic, rezultînd nucleozid 5'-difosfaţi si nucleotid 5'-trifosfaţi, compuşi cu rol esenţial în celulă. De exemplu, este bine cunoscut rolul de rezervor general de energie în procesele metabolice a ATP, care înmagazinează energia eliberată la etapele catabolice exogene şi o furnizează în fazele anabolice endogene.

Unii nucleozid difosfaţi, aşa ca UDP şi CDP, functionează drept activatori ai anumitor precursori metabolici. De exemplu, glucoza poate participa la biosinteza glicogenului numai după activare la UDP-glucoză. Colina intervine în procesul de biosinteză a fosfatidil-colinei după activarea la CDP-colină.

Moleculele acidului dezoxiribonucleic au drept unităţi structurale dezoxiribonucleotidele dAMP, dGMP, TMP şi dCMP. Cea mai mare parte din ADN este localizat în nucleu, în cromozomi, unde îndeplineşte funcţia de depozitare şi transmite a informaţiei genetice din generaţie în generaţie. ADN are masa moleculară mare, de ordinul 6 - 14×10^6. Structura primară a ADN este imprimată de succesiunea nucleotidelor în catena polinucleotidică. Structura secundară a ADN a fost descoperită de Watson şi Crick, care au demonstrat că ADN are o structură bicatenară, cele doua catene polinucleotidice fiind legate prin punţile de hidrogen dintre bazele complimentare: adenina - timina (A-T) şi guanina - citozina (G-C).

ARN este constituit din ribonucleotidele: AMP, GMP, CMP, şi UMP. ARN şi în majoritatea cazurilor este monocatenar. Se disting trei tipuri de ARN:

1. ARN mesager (ARNm)
2. ARN de transfer (ARNt)
3. ARN ribozomal (ARNr)

În conservarea şi transmiterea informaţiei genetice sunt implicate 3 procese:

1. *Replicarea sau biosinteza* ADN. Replicarea ADN implică participarea unui complex multienzimatic, denumit ADN replicaza (ADN polimeraze I, II, III, ADN ligaze şi alte enzime), ADN parental, care serveşte ca matriţă pentru biosinteza catenelor noi complimentare de ADN, 4 tipuri de dezoxiribonucleozidtrifosfaţi TTP, dCTP, dATP, dGTP, ioni de magneziu

şi alţi factori, ceea ce duce la biosinteza de noi molecule de ADN identice cu molecula iniţială.

2. *Transcrierea* mesajului genetic de la ADN la ARN, sau biosinteza ARN. Sinteza ARN necesită matriţă de ADN şi se desfăşoară în sensul 5′→3′. Este necesară şi prezenţa celor 4 tipuri de ribonucleotrifosfaţi (ATP, GTP, CTP, UTP), ionilor de Mg^{2+} şi Mn^{2+} şi ARN-polimerazei.

În procesul transcrierii mesajului genetic, ARN se sintetizează sub forma unui precursor care cuprinde în molecula sa, pe lîngă fragmentele purtătoare de informaţie (exoni), şi fragmente care nu au rol informaţional (introni). În cadrul unui proces de măturare, din molecula ARN se îndepărtează intronii, iar exonii se leagă între ei şi se formează ARN-biologic activ.

3. Transferarea mesajului genetic codificat în ARN la moleculele proteice în cadrul biosintezei specifice a proteinelor structurale şi funcţionale. În sinteza proteinelor se pot distinge 5 etape importante:

a) *Activarea aminoacizilor* care necesită următorii componenţi: ATP, aminoacizi, ARNt, aminoacil-ARNt-sintetaza şi Mg^{2+},

b) *Iniţierea biosintezei* lanţului polipeptidic. Componenţii necesari în această etapă sunt: aminoacil-ARNt-iniţiator, ARNm cu codonul de iniţiere GTP şi Mg^{2+}, factorii de iniţiere şi subunităţi ribozomale 30s şi 50s.

c) *Elongarea* lanţului polipeptidic suscită aminoacil-ARNt specificat de codon, Mg^{2+}, GTP, factori de elongare şi peptidiltransferaza.

d) *Terminarea* lanţului polipeptidic. Această etapă necesită codonii de terminare de ARNm şi factorii de eliberare a polipeptidului.

e) *Asamblarea proteinelor.* Foldingul.

Reglarea sintezei proteinelor, respectiv a enzimelor, se face prin control genetic (teorie elaborată de Jacob şi Monod). Numeroase antibiotice influenţează la diverse nivele procesul de biosinteză proteică.

Mutaţiile reprezintă modificări ale structurii ADN. Mutaţiile punctiforme pot avea loc prin înlocuirea, pierderea sau introducerea unei perechi de nucleotide în molecula de ADN. Mutaţiile pot avea loc spontan sau sub influenţa unor agenţi mutageni fizici (radiaţii Röentgen, UV, etc.), chimici şi biologici. Mutaţiile constituie sursa primordială a variabilităţii organismelor vii. Însă ele pot duce şi la maladii ereditare, datorate unor defecte enzimatice congenitale.

Ingineria genetică reprezintă un ansamblu de metode şi tehnologii efectuate in vitro cu gene în scopul transferării informaţiei genetice de la o specie la alta, urmărindu-se realizarea unor obiective bine determinate.

TEMA 6

Nucleotidele şi structura covalentă a acizilor nucleici

Experienţa 1. ***Izolarea simultană a ADN-ului şi ARN-ului.***

Se cunosc mai multe procedee de izolare a ARN-lui din celule şi ţesuturi, variind gradul lor de complexitate. Numeroase companii oferă substanţe, reagenţi, soluţii pentru izolarea "nedureroasă" a ARN-ului din diferite surse biologice. A fost propusă o metodă pentru recuperarea simultană a ARN-ului, ADN-ului şi proteinelor din aceeaşi sursă biologică. Această metodă nu necesită echipament special şi are la bază fracţionarea selectivă a ARN-ului şi ADN-ului prin adaptarea pH-ului fenolomogenatului. ARN-ul este recoltat în faza apoasă prin extragerea probei la pH acid, iar ADN-ul în interfază şi faza organică. După transferarea fazei apoase într-un tub nou, ADN-ul se extrage din interfază şi faza organică prin stabilirea unui pH alcalin. Această reacţie este cunoscută sub denumirea de extragere inversă. Cercetătorul poate schimba pH acid al fenolomogenatului prin adăugarea de acetat de sodiu, pH = 4,9, sau prin simpla extragere a SDS/EDTA lizat (pH = 8,7) cu un volum egal de fenol:cloroform:alcool izoamilic (25:24:1), pH-ul total fiind aproximativ egal cu 7,6.

Celulele pot fi distruse direct în ţesut, sau după recoltare. Celulele se dispersează cu precauţie înaintea distrugerii. ADN-ul genomic trebuie să fie purificat, deoarece forţele moleculare mari vor denatura ADN-ul într-un timp foarte scurt. Fracţionarea fragmentelor poate fi foarte joasă.

Mod de lucru.

1. Preparaţi soluţie de fenol : cloroform : alcool izoamilic, saturînd în prealabil fenolul de 2–3 ori cu apă.

2. Pentru recoltarea ţesuturilor îndepărtaţi creşterea medie prin aspiraţie şi spălaţi stratul mediu de 2 ori cu 5 ml de PBS rece (pentru prepararea 1 l de PBS se iau 8,0 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4, 0,24 g de KH_2PO_4). Vasele pentru recoltare se ţin la rece. Îndepărtaţi prin aspiraţie cît mai mult PBS.

Opțional: prepararea celulelor pentru lizare prin răcirea lor directă pe gheață timp de 30 min.

Notă: răcirea reagenților și celulelor pe gheață este o metodă excelentă de a controla activitatea RNA-azelor. Responsabilitatea cercetătorului este de a determina dacă o incubație timp de 30 min pe gheață înainte de liză influențează biochimia celulară.

3. Adăugați 2 ml de reactiv de lizare rece (10 mM EDTA, pH=8,0; 0,5% SDS) la 100 mm de țesut recoltat (4-5x10^6 celule). Înclinați atent vasul pentru a observa liza celulelor. Incubați conținutul vasului pe gheață timp de 3 min. Produsul de liză se poate trece pentru incubare în alt vas. O agitare usoară este binevenită. Nu utilizați o cantitate de lizat pentru mai mult de 2 vase de 100 mm de țesut recoltat. Celulele care au fost recoltate din țesut trebuie lizate, utilizînd 200 de μl de lizat pentru 10^6celule.

Pentru țesut, se taie țesut proaspăt izolat (pînă la 100 mg) pe gheață. Pentru fiecare mg de țesut se adaugă 250μl (10 mM EDTA, pH=8,0; 0,5% SDS) lizat și se omogenează ușor la temperatura camerei. Nu utilizați la omogenizare un politron, căci va cauza replicarea inacceptabilă a ADN-ului genomic.

4. Transferați omogenatul într-un tub cu 15 ml de polipropilenă racită în prealabil pe gheață.

Notă: datorită consistenței vîscoase a cromatinei eliberale, recoltatorul steril este folosit pentru obținerea cantitativă a omogenatului.

Opțional. Recoltarea celulelor lizate prin transferul din vas în vas, poate fi substituită prin spălarea fiecărui vas cu 2 ml soluție de 10 mM EDTA, 100 mM de acetat de Na, pH=4,9, sau păstrarea omogenatului mai concentrat cu 1 ml de soluție de 10 mM EDTA, 0,15 M de acetat de Na la pH 4,9.

4. Adăugați un volum egal de tampon organic rece, preparat în prealabil. Verificați compatibilitatea tubului de la centrifugă cu fenol și cloroform.

5. Amestecați atent tuburile rotindu-le atent de cîteva ori. Nu le agitați! Recolta va fi mai bună atunci cand va fi menținută mereu pe gheață și nu se va agita.

6. Probele se centrifughează pentru a separa materialul apos de cel organic.

Atenție! Nu depășiți viteza rotațiilor recomandată sau forța g maximă recomandată pentru orice tub folosit în experiență.

Extragerea ARN-ului

7. Colectaţi stratul apos şi transferaţi-l într-un tub nou, răcit în prealabil. Aveţi grijă să nu întrerupeţi interfaza proteinelor. Extragerea ARN-ului se face din interfază (sau faza organică) şi poate fi amînată pînă la îndeplinirea tuturor cerinţelor pentru extragerea ARN-ului, ţinînd tuburile pe gheaţă.

8. Adăugaţi în eprubetă un volum egal de amestec organic proaspăt descris anterior.

9. Centrifugaţi eprubeta. Transferaţi stratul luchid format într-un tub nou.

10. Adăugaţi 500 µl de 1 M de Tris-Cl rece, pH=8,0 şi 200 µl de 5 M de NaCl pentru fiecare 4 ml de ARN ce conţine material apos. Amestecaţi atent. Adăugaţi apoi 12 ml (sau 2,5 volume) de etanol de 95% rece şi amestecaţi. Păstraţi conţinutul eprubetei pentru cel puţin 1 oră la temperatura de 20°C.

11. Colectaţi ARN-ul precipitat prin centrifugare la 10000g timp de 10 min. Este recomandată centrifugarea la 4°C. Filtraţi şi separaţi supernatantul.

12. Spălaţi corpii celulari de 2-3 ori cu etanol 70%. Centrifugaţi din nou pentru a separa precipitatul. Filtraţi şi separaţi supernatantul.

13. Lăsaţi proba să se usuce. La dorinţă, se poate spăla cu etanol de 95%, ceea ce va accelera uscarea.

14. Dizolvaţi corpii celulari de ARN în 200 de µl de TE tampon rece (10 mM Tris-clor, pH=8,0, 1 mM EDTA). Incubaţi conţinutul eprubetei pe gheaţă timp de 1 oră, apoi transferaţi-l într-un tub de centrifugare. O altă cantitate de TE tampon se foloseşte la spălarea tubului de centrifugare şi se adaugă la prima soluţie.

15. Adăugaţi 6 µl de 5 M NaCl şi 0,98 ml de etanol rece pentru fiecare 300 µl de soluţie de ARN. Incubaţi conţinutul pe gheaţă timp de 5-10 min. Soluţia se va tulbura ca urmare a formării precipitatului de ARN. Proba se va păstra fără a scurge etanolul la - 80°C sau va fi procesată imediat.

16. Colectaţi ARN precipitat la centrifugare într-o microcentrifugă timp de 10 min la 2-4 °C. Filtraţi supernatantul şi uscaţi-l pentru a înlătura excesul de etanol (14).

17. Resuspendaţi corpii celulari ai ARN-ului în volumul minim al soluţiei-tampon (DEPC-tratată cu apă, de exemplu) şi lăsaţi-i 15 min pe gheaţă pentru a redizolva proba. În dependenţă de gradul de uscare a probei, poate fi necesară o incubaţie mai de lungă durată pentru a redizolva complet proba.

18. Calculaţi concentraţia ARN-ului, păstraţi probele hidratate în soluţiile adecvate la - 80°C.

Extragerea ADN-ului

19. Folosiţi tuburile cu material organic din punctul (6). Îndepărtaţi orice material apos. Dacă doriţi, înlăturaţi şi o mică cantitate de interfază pentru a facilita înlăturarea oricărei urme de ARN. Aceasta de obicei nu e necesar, deoarece ARN rezidual va fi hidrolizat în următoarele etape. De altfel, ADN-ul purificat poate fi incubat cu ARN-aze pentru a înlătura toate urmele de ARN.

20. La materialul organic/interfază ramas adăugaţi un volum egal de 1 M de Tris bază. Soluţia se va aduce la un pH-ul de 10,5. Amestecaţi atent fară a agita.

Notă: această etapă se numeşte extragere inversă; crearea unui mediu puternic alcalin va aduce ADN-ul în faza apoasă.

21. Se centrifughează probele la 2000 g timp de 15 min la 4°C, dacă e posibil, pentru a separa materialul apos de cel organic. Transferaţi atent faza apoasă într-un alt tub.

Atenţie! Nu depăşiţi viteza rotaţiilor recomandată sau forţa g maximă recomandată pentru orice tub folosit în experienţă.

22. Repetaţi extragerea, dar nu amestecaţi cele 2 faze apoase. Păstraţi-le în tuburi de centrifugare separate.

23. La fiecare Tris:ADN probă apoasă, adăugaţi un volum egal de cloroform:alcool izoamilic (24:1). Amestecaţi bine şi centrifugaţi. La centrifugare se separă fazele (cloroformul în absenţa fenolului se sedimentează repede). Treceţi faza apoasă într-un alt tub.

24. Precipitaţi ADN-ul cu 0,1 volum de 3 M de acetat de Na, pH=7,0 şi 2,5 volume de etanol 95%. Amestecaţi bine.

Notă: adăugarea etanolului va cauza precipitarea imediată a materialului genomic. ADN-ul precipitat poate fi colectat prin centrifugarea la viteză mică (500g) timp de 2-3 min. De altfel, ADN-ul genomic poate fi pescuit din soluţia de etanol, utilizînd pipeta Pasteur astfel încît lipirea ADN-ului de sticlă să fie minimă.

25.Transferaţi ADN-ul precipitat într-un tub de microcentrifugă nou. Spălaţi ADN-ul cu 500 µl soluţie de etanol de 70% pentru a înlătura excesul

de sare. Dizolvați ADN-ul precipitat într-o soluție-tampon adecvată (TE bufer, pH=8,0) și determinați concentrația de ADN.

Notă: Purificarea ARN-ului din celulele țesutului se poate face prin mai multe metode. Majoritatea lor se bazează pe sodiumdodecilsulfat (SDS) (1) sau guanidiumtiocianat (2,3), care lizează simultan celulele și inactivează ribonucleazele endogene. În aceste procedee ARN este separat din ADN-ul celular și proteine prin centrifugare.

Experienta 2. ***Hidroliza nucleoproteidelor din drojdii și reacțiile calitative pentru componentele nucleoproteidelor.***

Drojdia de bere este foarte bogată în nucleoproteide. Pentru studierea compoziției chimice a acestora se realizează hidroliza acidă a drojdiilor. Prin reacții specifice se identifică produsele de hidroliză – polipetidele, bazele purinice, glucidele și acidul fosforic.

Mod de lucru. Într-un balon Kjeldahl cu capacitatea de 100 ml se introduc 2,5 g de drojdii, se adaugă 20 ml soluție de acid sulfuric de 10%. Balonul se astupă cu un dop prevăzut cu un tub lung de sticlă ce îndeplinește rolul de refrigent cu curent de aer. Hidroliza drojdiei se efectuează la încălzire timp de 60 min. După răcire într-un curent de apă de robinet, hidrolizatul se filtrează și este utilizat pentru reacțiile calitative ale componentelor nucleoproteidelor.

Reacția biuretului (identificarea polipeptidelor)

La 5 picături de hidrolizat se adaugă 10 picături soluție de hidroxid de sodiu de 10% și 2 picături soluție de sulfat de cupru de 1%. Eprubeta se agită; apare o colorație roză, roz-violetă.

Reacția de argint (identificarea bazelor purinice)

La 10 picături de hidrolizat se adaugă picătură cu picătură soluție concentrată de NH_3 (circa 10 picături) și 10 picături de soluție amoniacală de nitrat de argint de 2%. După 3-5 minute se formează un precipitat brun deschis de săruri de Ag ale bazelor purinice.

Reacția Molisch (identificarea pentozelor)

La 10 picături de hidrolizat se adaugă 3 picături soluție alcoolică de timol

de 1%. Conţinutul se agită şi se adaugă cu precauţie pe pereţii eprubetei 20-30 picături de acid sulfuric concentrat. La fundul eprubetei se formează un produs de condensare a furfurolului cu timolul de culoare roşie (sub influenţa acidului sulfuric concentrat riboza pierde 3 molecule de apă, transformîndu-se în furfurol).

Reacţia molibdenică (identificarea acidului fosforic)

La 10 picături de hidrolizat se adaugă 20 picături de reactiv molibdenic. Amestecul fiind încălzit imediat pe o baie de apă timp de cîteva minute, se colorează în galben deschis. După răcirea soluţiei într-un curent de apă rece, apare un precipitat cristalin galben-deschis de fosfomolibdat de amoniu.

Reacţia difenil-aminică (identificarea ribozei şi dezoxiribozei)

Difenilamina reacţionează cu dezoxiriboza dînd o coloraţie albastră, iar cu riboza – verde. La 5 picături de hidrolizat se adaugă 20 picături soluţie de difenilamină de 1%. Conţinutul eprubetei se fierbe timp de 15 minute pe o baie de apă. Se observă culoarea apărută şi se trag concluzii.

Teme pentru autopregatire

1. Principiul reacţiei de identificare a componentelor nucleopreoteidelor.
2. Tipurile de acizi nucleici, funcţiile şi repartizarea lor în celulă.
3. Constituienţii acizilor nucleici: bazele azotate, pentozele, acidul fosforic.
4. Nucleozidele şi nucleotidele 3′, 5′- cAMP.
5. Structura primară, secundară şi terţiară a acidului dezoxiribonucleic. Cromatina. Nucleosomul.
6. Structura acizilor ribonucleici (ARNt, ARNm, ARNr).
7. Denaturarea şi hibridizarea acizilor nucleici.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Scrieţi formula generală a nucleotidelor.
2. Scrieţi formula ATP.
3. Scrieţi formula cAMP.
4. Scrieţi formula dezoxiguanilatului.
5. Scrieţi formula timidilatului.
6. Scrieţi formula adenozinei.

7. Scrieţi formula uridilatului.

8. Scrieţi formula citidilatului.

9. Scrieţi formula GDP.

10. Scrieţi formula tetradezoxiribonucleotidului 5′-ATGC 3′.

11. Scrieţi formula tetraribonucleotidului 5′-UGCA- 3′.

12. Ce deosebire există în structura dinucleotidelor ce se întîlnesc în acizii nucleici şi structura dinucleotidelor care prezintă coenzimele dehidrogenazelor?

13. Numiţi toate tipurile de legături ce există în structura acizilor nucleici.

14. Combinaţia din imaginea alăturată prezintă:

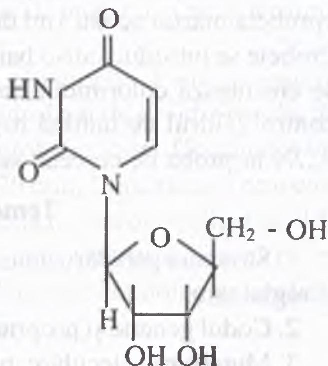
a) Uracil;

b) Uridină;

c) Nucleozid;

d) Nucleotid;

e) Dezoxiribonucleotid.



15. În spirala dublă a ADN-ului (subliniaţi răspunsurile corecte):

a) cele 2 lanţuri nucleotidice sunt paralele;

b) adenina unei catene se împerechează cu citozina celeilaltei catene, iar guanina cu timina;

c) bazele hodrofobe sunt aranjate în interiorul spiralei, iar scheletele hidrofile – în afara ei;

d) o spiră include cca 10 perechi de nucleotide;

e) ambele lanţuri de ADN sunt identice în ceea ce priveşte succesiunea bazelor azotate şi compoziţia nucleotidică.

16. Calculaţi cifra medie a perechilor de nucleotide ce revin unui micron al spiralei duble de ADN.

17. ADN-ul bacteriofagului M_{13} are urmatoarea compoziţie nucleotidică A-23%; T-36; G-21%; C-20%. Ce indică aceste cifre?

18. Calculaţi numărul perechilor de nucleotide ce se conţin într-un milion de daltoni din masa spiralei duble de ADN.

19. În preparatele de ADN, separate din 2 specii de bacterii neidentificate, conţinutul de adenină constituie 32% şi 17%. Care este ponderea de guanină, timină şi citozină în aceste 2 preparate? Una din aceste bacterii a fost izolată dintr-un izvor hidrotermal (64°C). Care ADN aparţine bacteriei termofile?

TEMA 7

Genele: reparația, mutațiile și clonarea. Replicarea (biosinteza acizilor dezoxiribonucleici)

Experiența 1. ***Identificarea ADN-ului.***

Principiul metodei. Metoda se bazează pe proprietatea dezoxiribozei din componența ADN de a da cu reactivul difenilaminic o coloratie albastră. Intensitatea culorii este direct proporțională cu cantitatea de ADN.

Mod de lucru. În eprubeta de cercetat se pun cu pipeta 1ml de hidrolizat de drojdie obținut în lucrarea precedentă și 2 ml de reactiv difenilaminic. În eprubeta martor se iau 1ml de apă distilată și 2 ml de reactiv difenilaminic. Probele se introduc într-o baie de apă la 100°C timp de 10 min. După răcire se efectuează colorimetrarea probei de analizat la FEC, contra probei de control (filtrul de lumină roșie și cuva de 5 mm grosime). Conținutul de ADN în proba de cercetat se determină după curba etalon.

Teme pentru autopregătire

1. Structura genelor: dimensiunile lor, intronii și exonii, genele structurale și reglatoare.
2. Codul genetic și proprietățile lui.
3. Mutațiile moleculare: prin substituție, suprimare și insețiile de nucleotide. Rolul mutațiilor
4. Replicarea ADN-ului – mecanismul, substratele, matricea, enzimele și factorii proteici, etapele biosintezei ADN. Telomeraza. Rolul și structura.
5. Reparația ADN-ului.

Întrebări pentru autocontrol

1. Întocmiți lista precursorilor și enzimelor necesare sintezei lanțurilor principale și întîrziate în procesul de replicare a ADN-ului.

2. Care va fi compoziția nucleotidică a lanțului ADN sintetizat de ADN-polimeraza pe matricea care prezintă molecula inelară monocatenară de ADN al fagului ∅174 cu următoarea compoziție nucleotidică G- 24,1%; C- 18,5 %; A-24,6 %;T-32,8%.

3. Scrieți compoziția nucleotidică a ADN-ului sintetizat de ADN – polimeraza în sistemul format din amestecul de inele (+) și (-) de ADN ale fagului ∅174.

4. Exactitatea replicării ADN-ului:
a) care factori asigură exactitatea replicării lanțului principal de ADN?
b) lanțul întîrziat se sintetizează cu aceeași exactitate ca și lanțul principal?

TEMA 8

Transcripția. Sinteza anticorpilor

Experiența 1. ***Determinarea ARN-ului.***

Principiul metodei se bazează pe reacția de culoare a reactivului orcinic cu riboza (soluția se colorează în verde). Intensitatea colorației este direct proporțională cu concentrația ribozei în soluția de analizat și se determină prin fotocolorimetrare.

Mod de lucru. În 2 eprubete se pun cu pipeta cîte 1 ml de reactiv orcinic. În prima eprubeta se adaugă 1ml de hidrolizat de drojdie (proba de analizat), iar în a doua - 1ml de apă distilată (proba martor). Conținutul lor se încălzește pe o baie de apă la 100°C timp de 20 min. După răcirea probelor într-un jet de apă de robinet se determină extincția probei de analizat la FEC contra probei de control, folosindu-se cuva de 5 mm și filtrul de lumină roșie.

După curba etalon se calculează conținutul de ARN în proba de analizat utilizînd valoarea E, găsită la fotocolorimetrare.

Teme pentru autopregătire

1. Transcripția sau biosinteza ARN-ului: matricea, substratele, enzimele, mecanismul.
2. Biosinteza ARN pe matrice de ADN.
3. Modificările posttranscripționale (processing).
4. Dogma centrală a geneticii moleculare. Concepția: o genă - un polipeptid.
5. Inhibitorii sintezei acizilor nucleici.
6. Ingineria genetică și semnificația ei practică. Sinteza anticorpilor.
7. Transcripția inversă.

Întrebări pentru autocontrol

1. Care sunt deosebirile de acțiune a ARN polimerazei și polinucleotid-fosforilazei?
2. Lanțul (+) singular de ADN (A- 21%; G- 29%; T 21% și C-29%) este

replicat de ADN- polimerază cu formarea lanțului (-) complementar. ADN-ul rezultat bicatenar este apoi utilizat ca matriță pentru ARN-polimerază, care transcrie lanțul (-). Scrieți compoziția nucleotidică a ARN sintetizat.

3. ADN-ul bacteriofagului φ174 este constituit din 5386 de nucleotide; această cantitate de nucleotide este insuficientă pentru codificarea celor 9 proteine sintetizate de acest virus. Explicați acest fenomen.

TEMA 9

Sinteza proteinelor și reglarea ei

Experiența 1. ***Determinarea proteinelor. Metoda biuretică*** (*Construcția curbei etalon*).

Principiul metodei. Proteinele, în mediul alcalin și în prezența sulfatului de Cu, formează un complex de culoare roșie-purpurie (reacția biuretului). Intensitatea colorației este direct proporțională cu concentrația proteinei în soluție.

Mod de lucru. În 3 eprubete se pune cu pipeta cîte 1 ml soluție standard de proteină în care concentrația proteinei este respectiv de 0,5; 1 și 1,5% (probele etalon). Aceste probe servesc pentru construirea curbei-etalon. În eprubeta a 4-a se ia 1 ml de soluție de proteină în care concentrația proteinei trebuie să se cunoască (proba de analizat).

1. În toate eprubetele se adaugă cîte 4 ml de reactiv biuretic. Conținutul eprubetelor se agită și se lasă în repaos la temperatura camerei timp de 20 de minute pentru dezvoltarea colorației. Probele sunt citite la FEC, folosindu-se cuva de 10 mm grosime și filtrul care corespunde lungimii de undă 540 nm (filtrul verde). Reactivul biuretic este folosit ca probă-martor sau de control.

2. Construirea curbei-etalon se realizează în modul următor: pe ordonată sunt înscrise valorile extincției E, iar pe abscisă – concentrația în ordine crescîndă a probelor-etalon. Unind punctele corespunzătoare tuturor probelor se obține o linie dreaptă care și se numeste curba-etalon.

3. Calcularea cantității de proteină în proba de analizat se face după curba-etalon, deoarece se cunoaște extincția acestei probe din punctul nr.2.

Experiența 2. ***Determinarea proteinelor totale din serul sanguin prin metoda biuretică.***

Mod de lucru. La 0,1 ml de ser sanguin se adaugă 5 ml de reactiv biuretic, evitîndu-se agitarea intensă şi formarea de emulsii. Dupa 30 min proba se citeşte la FEC, folosindu-se cuva de 1cm şi lungimea de undă 540-560 nm (filtrul verde). Ca martor (soluţie de comparare) se foloseşte reactivul biuretic. Calculul se realizează după curba-etalon.

Valoarea diagnostică. În serul sanguin, cantitatea de proteine totale în normă variază între 6,5 şi 8,5 gr/100 ml sau 65-85 gr/l. Proteinele din serul sanguin scad pînă la 4-5 gr/l (hipoproteinemie) în nefroze, inaniţie, ciroze, la pierderea proteinei în urma hemoragiilor şi formării exsudatelor. Hiperproteinemia se poate întîlni la pacienţii cu mielom, diabet insipid, vomitări frecvente, diaree, în cazurile de deshidratare a organismului.

Experienţa 3. ***Identificarea acidului fenilpiruvic din urină.***

Principiul reacţiei. Acidul fenilpiruvic formează cu Fe^{3+} o combinaţie complexă, colorată în verde-albastru.

Mod de lucru. La 2 ml de urină se adaugă 8-10 picături de triclorură de Fe de 10%. După 30-60 sec, urina se va colora în verde-albastru dacă ea conţine acidul fenilpiruvic.

Valoarea diagnostică. Prezenţa acidului fenilpiruvic în urină indică la copii maladia congenitală – oligofrenia fenilpiruvică; în sînge este ridicată concentraţia de fenilalanină.

Teme pentru autopregătire

1. Ribozomii – sediul sintezei proteinelor, structura lor.
2. Biosinteza proteinelor. Etapele:
   a) Activarea aminoacizilor;
   b) Iniţierea sintezei lanţului polipeptidic;
   c) Elongarea lanţului polipeptidic;
   d) Terminarea sintezei proteinei;
   e) Modificările posttranslaţionare ale proteinelor. Asamblarea proteinelor-foldingul.
3. Reglarea biosintezei proteinelor. Inducţia şi represia enzimelor.
4. Inhibitorii sintezei proteice.
5. Polimorfismul proteinelor (variantele hemoglobinei, enzimelor, grupelor sanguine).
6. Bolile ereditare şi diagnosticul lor biochimic.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. ADN setului haploid de cromozomi ai celulei omului este alcătuit din 2,3x10⁹ perechi de nucleotide. Calculaţi numărul de proteine codificate de această cantitate de ADN. Într-adevar în organismul uman se sintetizează această cantitate de proteine?

2. Metionina are un singur codon. Acesta codifică atît restul de iniţiere cît şi resturile interne de metionină în polipeptidele sintetizate de E. coli. Explicaţi acest fenomen.

3. Pornind de la succesiunea aminoacizilor din proteină, putem prezice succesiunea nucleotidelor din unicul ARNm care codifică această proteină?

4. Calculaţi lungimea medie (în Å) şi masa medie (în Da) a genelor care codifică:

a) ARNt (90 mononucleotide);

b) ribonucleaza (124 resturi de aminoacizi);

c) Miozina (1800 resturi de aminoacizi).

5. ARNt-cis este convertit în ARNt-ala. t-ARN-ala rezultat este utilizat în sistemul de sinteză al proteinei unde poli-UG serveşte ca matrice. Ce polipeptidă se sintetizează?

6. Calculaţi cheltuielile energetice (sub formă de legături fosfat-macroergice) necesare la sinteza lanţului β al hemoglobinei (constituit din 146 resturi de aminoacizi).

7. Scrieţi toate secvenţele posibile al ARNm capabile să codifice tripeptidul Leu-Met-Tir.

8. Enzima constituită din 192 resturi de aminoacizi este codificată de o genă ce conţine 1440 perechi de baze. Explicaţi legătura reciprocă dintre aceste două cifre.

9. Preziceţi succesiunea aminoacizilor în polipeptidele sintetizate în ribozomi după următoarele matrici:

a). GGUCAGUCGCUCCUGAUU;

b). UUGGAUGCGCCAUAAUUUGCU;

c). AUGGACGAA.

10. Care din substituţiile aminoacizilor enumerate mai jos, apărute în urma mutaţiilor punctiforme, se împacă cu codul genetic? Dacă unele sunt incompatibile, atunci explicaţi cauza incompatibilităţii. 1. Fen-Leu; 2. Ile-Leu; 3. Ala-Tre; 4. Pro-Ser; 5. Liz-Ala; 6. His-Glu.

11. Pe una din catenele ADN-ului se înregisrtează următoarea succesiune a nucleotidelor:

5'-…………ATCGTCGACGATGATCATCGGCTACTCGA……….-3'

Această succesiune este descifrată în direcţia 5'→ 3'. Scrieţi:

a) Succesiunea bazelor în catena complementară în direcţia 5' → 3';

b) Succesiunea bazelor din ARNm;

c) Succesiunea aminoacizilor din lanţul polipeptidic.

12. Comparaţi lungimea genei cu lungimea lantului polipeptidic codificat de această genă dacă proteina este constituită din 150 resturi de aminoacizi şi se găseşte sub formă de α-spirală.

13. În timpul translaţiei ARNm următorii aminoacizi se includ direct în lanţul polipeptidic: a) asparagina; b) 4-hidroxiprolina; c) parahidroxifenilalanina; d) homoserina; e) fosfoserina.

14. Care din următoarele poliribonucleotide sintetice pot fi utilizate la sinteza polipeptidului …….. -Ile-Tir-Ile-Tir-…….. :

a) poli-(AUUA);

b) poli-(AUAU);

c) poli-(UAU);

d) poli-(AUA);

e) poli-(UA).

TEMA 10

Colocviu la temele: Proteine. Enzime. Acizi nucleici

CAPITOLUL III

Metabolismul general. Bioenergetica.
Oxidarea biologică. Lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă

Metabolismul prezintă totalitatea transformărilor materiale şi energetice ce asigură creşterea, dezvoltarea şi supravieţuirea organismului. El este o activitate celulară cu destinaţie specială, determinată de interconexiunea sistemelor multienzimatice.

Metabolismul îndeplineşte următoarele funcţii: a) aprovizionarea celulelor cu energie chimică, eliberată în urma scindării substanţelor nutritive; b) transformarea moleculelor substanţelor nutritive în blocuri de construcţie, utilizate de celulă la sinteza macromoleculelor proprii; c) sinteza şi degradarea biomoleculelor necesare pentru îndeplinirea unor funcţii specifice în celulă (pigmenţi, hormoni, coenzime, mediatori etc.).

În procesul de oxidare a substanţelor se produce o anumită cantitate de energie liberă. O parte din aceasta se consumă pentru efectuarea unui anumit volum de lucru, restul se acumulează în compuşi macroergici (ATP, etc.).

Sinteza ATP-ului constă dintr-un ansamblu de reacţii în care energia eliberată la dehidrogenarea unui metabolit, a unui substrat energic este utilizată imediat pentru fosforilarea ADP-ului în ATP. Procesul în ansamblu se numeşte fosforilare oxidativă, cuplată cu oxidarea de substrat.

Interacţiunea oxigenului cu hidrogenul are loc în câteva etape succesive în care atomii de hidrogen sau numai electronii lor sunt transportaţi pe sisteme redox cu afinităţi crescînde pentru echivalenţii reducători ca în final aceştea să fie acceptaţi de către molecula de oxigen.

Ansamblul sistemelor redox (enzimelor care participă la transferul echivalenţilor reducători – protonii de hidrogen sau electronii de la coenzimele reduse pînă la oxigen) poartă denumirea de lanţ respirator.

Energia liberă, ce devine disponibilă la trecerea electronilor prin lanţul respirator în direcţia gradientului de potenţial, este parţial utilizată pentru sinteza de ATP (La oxidarea NADH-ului se consumă 52,6 kcal ca şi la sinteza a trei molecule de ATP). Lanţul respirator cuprinde trei puncte de fosforilare, adică trei puncte de cuplare a celor două procese: oxidativ şi fosforilant.

TEMA 11

Noţiuni generale de metabolism. Căile generale de scindare a proteinelor, glucidelor şi lipidelor. Noţiuni de bioenergetică. Oxidarea piruvatului şi ciclul Krebs

Experienţa 1. ***Determinarea activităţii dehidrogenazelor ciclului Krebs (izocitrat, α-cetoglutarat şi succinatdehidrogenazelor) în ficat prin metoda neotetrazolică.***

Principiul metodei. Dehidrogenazele ciclului acizilor tricarboxilici catalizează reacţiile de oxidare a substratelor respective prin dehidrogenare. În calitate de acceptor de hidrogen se foloseşte neotetrazolul care reducîndu-se se transformă în formazon colorat în roz. După intensitatea culorii se determină activitatea enzimelor.

Mod de lucru. Într-o eprubetă de centrifugare se introduc 0,25 ml de substrat respectiv, 0,5 ml soluţie de neotetrazol, 0,1 ml soluţie de NAD (în afară de eprubeta în care se determină activitatea succinatdehidrogenazei) şi 0,5 ml omogenat hepatic. În eprubeta, în care se determină activitatea izocitratdehidrogenazei, se mai adaugă 0,1 ml $MgCl_2$. Eprubeta se agită şi se incubează timp de 10 minute în baia de apă la 37°C.

După incubare, în fiecare eprubetă se adaugă cîte 5 ml acetonă (pentru stoparea activităţii enzimatice). Eprubetele se astupă cu dopuri şi se lasă la întuneric timp de o oră, apoi se centrifughează timp de 10 minute cu viteza de 1000 rotaţii/min. Centrifugatul se fotocolorimetrează la o lungime de undă de 525 nm (filtrul verde), cuva de 10 cm faţă de proba de control.

Notă. Se pregătesc 1-2 probe de control, care au acelaşi conţinut ca şi probele de experienţă numai că în loc de omogenat se adaugă 0,5 ml soluţie tampon. Calculele se fac după curba-etalon.

Importanţa metodei. Determinarea activităţii enzimelor indicate prezintă informaţie preţioasă privind starea metabolismului ţesutului respectiv.

Teme pentru autopregătire

1. Noţiuni generale de metabolism. Catabolismul şi anabolismul. Căile metabolice centrale, ciclice şi specifice.

2. Metabolismul intermediar. Metodele de studiere.

3. Noţiuni de energie liberă standard. Compuşi macroergici - structura chimică şi rolul lor. Ciclul ATP-ului.

4. Caracteristica stării energetice a celulei. Indicii ce o caracterizează. Reglarea metabolismului celular.

5. Decarboxilarea oxidativă a acidului piruvic – enzimele, cofactorii, reglarea.

6. Ciclul Krebs – reacţiile parţiale. Esenţa biologică a ciclului Krebs, reglarea lui. Noţiune de fosforilare la nivel de substrat. Stoichiometria ciclului Krebs.

7. Reacţiile anaplerotice (reacţiile care furnizează produse intermediare ale ciclului acizilor tricarboxilici).

Situaţii de problemă

1. Numiţi toate enzimele ciclului Krebs şi arătaţi tipurile reacţiilor catalizate de ele. Unde este localizat acest ciclu în celulă?

2. Enumeraţi componentele complexului piruvatdehidrogenazic. Scrieţi formulele vitaminelor care intră în componenţa acestui complex. Arătaţi schematic procesul de formare a acetil-CoA.

3. De ce ciclul acizilor tricarboxilici este un proces aerob?

4. Ce cantitate de energie se eliberează la descompunerea unui mol de ATP în condiţii standard? Care este durata vieţii moleculei de ATP în celulele organismelor superioare?

5. Ţinînd cont de faptul că în organismul omului matur în fiece zi se formează o cantitate mare de ATP, structura, compoziţia şi masa corpului nu se modifică evident în acest timp. Cum se poate explica aceasta?

6. Care enzime ale ciclului Krebs sunt reglatorii? Care metaboliţi şi în ce mod influenţează activitatea acestor enzime? Explicaţi caracterul amfibolic al ciclului Krebs.

7. Oxalilacetatul se formează în ultima etapă a ciclului Krebs:

a) E posibilă oare sinteza OA din acelil-CoA doar sub acţiunea enzimelor şi cofactorilor ciclului Krebs fără utilizarea produselor intermediare ale ciclului? Daţi răspuns detaliat.

b) Cum se completează rezervele de OA?

8. ATP sintetizat în mitocondrii trebuie utilizat în celulă?

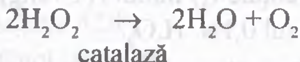
a) Cum ATP părăseşte mitocondriile?

b) Cum se completează rezervele de ADP şi de fosfat anorganic?

TEMA 12

Oxidarea biologică. Lanțul respirator și fosforilarea oxidativă

Experiența 1. ***Reacția calitativă de determinare a activității catalazei.***

Principiul metodei. Catalaza face parte din clasa oxidoreductazelor. Ea se conține în toate țesuturile și lichidele biologice. Într-o cantitate mai mare catalaza se întîlnește în eritrocite și ficat. La oxidarea unor substanțe se formează peroxid de hidrogen, substanță toxică care se poate acumula în organism. Rolul biologic al catalazei constă în descompunerea peroxidului de hidrogen în oxigen și apă: 

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalază}} 2H_2O + O_2$$

Catalaza conține fier. La descompunerea peroxidului de hidrogen are loc oxidarea și reducerea fierului care intră în componența acestei enzime.

Mod de lucru. Activitatea catalazei sîngelui. În două eprubete se iau cîte 1ml H_2O, se adaugă 2 picături de sînge. O probă se fierbe pentru inactivarea enzimei. După racire în ambele eprubete se adaugă cîte 5-10 picături soluție de H_2O_2 de 3% și conținutul eprubetelor se agită. În eprubeta de experiență se observă degajarea bulelor de oxigen.

Experiența 2. ***Determinarea cantitativă a catalazei în sînge.***

Principiul metodei. Această metodă se bazează pe determinarea cantității *de H_2O_2 descompusă de enzimă într-o perioadă anumită de timp după* următoarea ecuație:



$$2\,KMnO_4 + 5\,H_2O_2 + 4\,H_2SO_4 \rightarrow 2\,KHSO_4 + 2\,MnSO_4 + 8\,H_2O + 5\,O_2$$

Activitatea catalazei se exprimă prin numărul de catalază și indicele de catalază. *Numărul de catalază* este cantitatea de peroxid de hidrogen, în mg, descompusă de 1 ml de sînge. Despre cantitatea de H_2O_2 descompusă se judecă după diferența cantității de $KMnO_4$ utilizat la titrare pînă și după acțiunea catalazei.

Mod de lucru. Sîngele diluat (1:1000) se agită. În două baloane se iau cîte 1 ml sînge, 7 ml apă distilată, în proba de experiență se adaugă 2 ml H_2O_2 de 1%, în cea de control - 5 ml soluție de H_2SO_4 de 10%. În mediul acid (proba de control) acțiunea enzimei se stopează, deoarece ea este activă la pH = 7,4. Baloanele se lasă pentru 30 minute la temperatura camerei. Apoi în proba de experiență se adaugă 5 ml soluție de H_2SO_4 de 10%, iar în cea de control - 2 ml soluție de H_2O_2 de 1%. Conținutul fiecărei probe se titrează cu soluție de $KMnO_4$ de 0,1 N pînă la culoarea roză. Se calculează unitatea

catalazei (UC) după formula: UC = (A - B) x 1,7, unde: A - cantitatea de soluție de $KMnO_4$ de 0,1N consumată la titrarea probei de control (ml); B - cantitatea de permanganat cheltuită la titrarea probei de experiență. O cantitate mai mare va merge la titrarea probei de control, unde catalaza nu acționează. Diferența căpătată o înmulțim la 1,7 și obținem indicele de catalază pentru sîngele studiat. În normă această unitate este egală cu 10 - 15 unități (vezi nota).

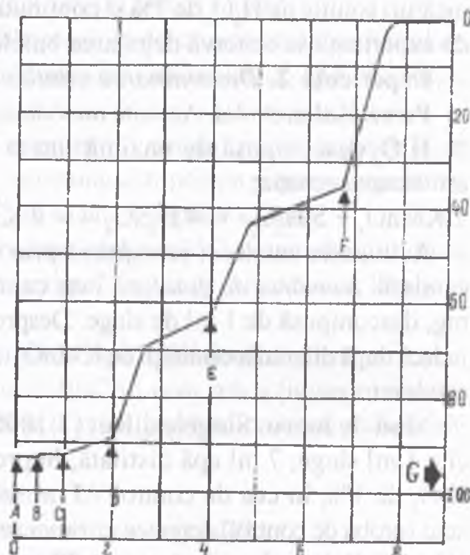
Notă: 1 mol/l H_2O_2 este de 17 g;

1 ml 0,1N soluție conține 1,7 mmol/l (1,7 mg) H_2O_2 și 1 ml 0,1 $KMnO_4$ este echivalent cu 1 ml 0,1N H_2O_2.

Importanța clinico-diagnostică. Determinarea activității catalazei sîngelui are importanță pentru diagnosticul cancerului, anemiei, tuberculozei. În cazul acestor boli, concentrația catalazei în sînge se reduce.

Experiența 3. ***Oxidarea malatului și glutamatului în mitocondrii (metoda polarografică).***

Principiul metodei. O pereche de electrozi (anod și catod) acoperiți cu o peliculă de polietilenă se introduc în vasul cu suspensie mitocondrială studiată. Oxigenul absorbit poate difuza prin peliculă ajungînd la electrozi. Alte substanțe din suspensie nu pot trece prin membrana polietilenică. Între electrozi se menține o tensiune constantă egală cu 0,65 V. La reducerea electrolitică a oxigenului pe catod, între electrozi se creează un curent proporțional conținutului de oxigen din amestecul reacționar. Intensitatea curentului se înregistrează automat.



Absorbția mitocondrială a oxigenului determinată cu ajutorul electrodului de oxigen.

Mod de lucru. Într-un vas se iau 3,7 ml amestec, care conţine 20 mmol soluţie tampon tris-HCl, 80 mmol KCl şi 5 mmol $MgCl_2$, pH = 7,4. La intervalele de timp indicate în imaginea de la p. 63, în vas se adaugă reactivele enumerate mai jos în următoarea ordine:

A - începutul înscrierii. În punctele notate au fost efectuate următoarele suplimente:

B - 0,1 ml suspensie mitocondrială din ficatul şobolanilor;

C – 0,1 ml soluţie ce conţine 0,5 ml de glutamat şi 0,1 ml de malat cu pH = 7,4;

D - 0,02 ml de 50 mmol soluţie ADP;

E - 0,05 ml de 10 mmol soluţie ADP;

F - 0,05 ml soluţie dinitrofenol 10 mmol.

Amestecul se pune la incubare (t = 30°C); toţi reactanţii au fost saturaţi cu aer. În imaginea de la p. 63 sunt indicate rezultatele experienţei obţinute la studierea respiraţiei mitocondriale prin metoda polarografică (cu ajutorul electrodului de oxigen).

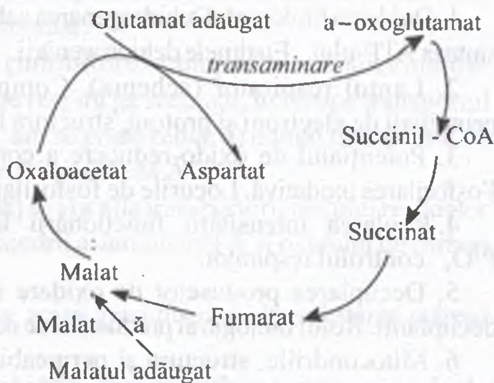
Determinaţi valoarea raportului P/O şi coeficientului respirator în cazul oxidării malatului – glutamatului. Oxidarea malatului şi glutamatului în mitocondriile ficatului are loc după schema de mai jos:

Corespunde oare raportul P/O dat reieşind din schema indicată acelei valori, care a fost obţinută experimental?

Notă: Într-un litru de soluţie apoasă saturată cu aer la 30°C se conţin 0,235 mM oxigen.

Experienţa 4. ***Fosforilarea oxidativă*** (sinteza ATP).

Principiul metodei. Energia eliberată în procesul oxidării substratelor (succinat, izocitrat, malat) este utilizată parţial la esterificarea fosfatului anorganic la sinteza ATP (ADP + Pi → ATP). Sursa enzimelor este suspensia de mitocondrii. Scăderea conţinutului de fosfat (utilizat la sinteza



Schema oxidării substratelor (la exp. 4).

ATP) în proba de experienţă se determină după molibdatul de amoniu şi acidul ascorbic faţă de proba de control (culoarea albastră este mai puţin intensă în proba de experienţă).

Mod de lucru.

Proba de experienţă. În eprubetă se ia 1 ml amestec de incubare (soluţie tampon de fosfaţi cu pH = 7,4, zaharoză, $MgCl_2$, KCl), 0,02 ml ADP, 0,5 ml soluţie de substrat respectiv (la indicaţia profesorului) şi 0,5 ml suspensie de mitocondrii. Proba se lasă pentru 25 minute la temperatura camerei, apoi în eprubetă se introduce 1 ml soluţie acid tricloracetic (10%). Conţinutul eprubetei se titrează.

Proba de control se efectuează concomitent cu proba de experienţă. În eprubetă se introduc aceiaşi reactivi ca şi în proba de experienţă cu excepţia, că în loc de 0,5 ml soluţie de substrat în eprubetă se introduc 0,5 ml de apă distilată.

Determinarea fosfatului. În altă eprubetă se introduc 1 ml de filtrat, 1 ml soluţie de molibdat de amoniu (25%) şi 0,5 ml soluţie de acid ascorbic (0,5%). Conţinutul eprubetei se agită, apoi se mai introduc 7,5 ml de apă distilată. Peste 10 minute probele (de control şi de experienţă) se colorimetrează la FEC (filtrul roşu, cuva – 10 mm) faţă de amestecul de incubare. Rezultatele se calculează după curba etalon, se trag concluziile respective.

Teme pentru autopregătire

1. Oxidarea biologică. Dehidrogenarea substratelor – sursa energetică pentru sinteza ATP-ului. Enzimele dehidrogenării.

2. Lanţul respirator (schema). Complexele enzimatice. Acceptorii principali de electroni şi protoni, structura lor chimică.

3. Potenţialul de oxido-reducere a componentelor lanţului respirator. Fosforilarea oxidativă. Locurile de fosforilare. Produsele finale ale oxidării.

4. Reglarea intensităţii funcţionării lanţului respirator. Coeficientul P/O, controlul respirator.

5. Decuplarea produselor de oxidare şi fosforilare, principalii agenţi decuplanţi. Rolul biologic al produsului de decuplare, respiraţia liberă.

6. Mitocondriile, structura şi permeabilitatea selectivă a membranelor pentru diferiţi compuşi. Sistemele-navetă de transport al echivalenţilor de reducere.

7. Ipotezele principale cu privire la procesele de fosforilare oxidativă. Ipoteza lui Mitchell.

8. Oxidarea microzomală, rolul citocromului P_{450} în reacţiile de oxido-reducere.

9. Vitaminele şi rolul lor în procesele de oxidare biologică.

10. Noţiune de radicali liberi. Oxidarea peroxidică a acizilor graşi nesaturaţi din membrane. Sistemele de protecţie a celulei împotriva acumulării radicalilor liberi.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Care vitamine şi substanţe cu activitate vitaminică intră în componenţa lanţului respirator? Scrieţi formulele lor.

2. De ce la reducerea NAD-ului are loc acidularea soluţiei? Ilustraţi aceasta prin exemplul reducerii NAD.

3. Adăugarea rotenonei la mitocondriile, care respiră pe glutamat, duce atît la încetarea sintezei ATP-ului, cît şi la transportul de electroni. Cum se pot restabili aceste procese? (Amintim că rotenona blochează transportul de electroni în lanţul respirator pe sectorul NAD - ubichinonă).

4. Adăugarea oligomicinei la mitocondrii, care respiră pe succinat, duce la întreruperea transportului de electroni şi a formării de ATP. Adăugarea ulterioară a dinitrofenolului sau a ionilor de Ca^{++}, conduc la reînceperea imediată a transportului de electroni în lanţul respirator fără generarea concomitentă de ATP. Care proces inhibă oligomicina?

5. Adăugarea malonatului (inhibitorul competitiv al succinatdehidrogenazei) la mitocondriile care respiră pe succinat, întrerupe transportul de electroni şi sinteza ATP-ului. Cum se poate relua: a) numai transportul de electroni? b) transportul de electroni şi sinteza ATP?

6. În ce stare (redusă sau oxidată) se vor afla transportorii lanţului respirator la adăugarea în suspensia de mitocondrii a antimicinei A şi oxidului de carbon CO?

7. De ce dinitrofenolul, tiroxina, acizii graşi liberi şi alte substanţe măresc termogeneza?

8. De ce sărurile acidului cianhidric, care nu influenţează procesele de dehidrogenare, blochează respiraţia tisulară?

9. Care este valoarea coeficientului P/O la oxidarea malatului, succinatului şi a izocitratului? Scrieţi reacţiile respective.

10. Calculati cîte molecule de NAD se formează la oxidarea completă a unei molecule de piruvat (pînă la CO_2 şi apă). Cîte molecule de ATP se vor forma în caz dacă toţi atomii de hidrogen vor intra în lanţul respirator?

11. Cîte molecule de ATP se generează la o rotaţie a ciclului Krebs în condiţiile în care toţi atomii de hidrogen intră în lanţul respirator? Arătaţi coeficientul P/O pentru fiecare substrat de oxidare. Explicaţi.

12. Reprezentaţi schematic calea lungă, medie şi scurtă de oxidare. Determinaţi numărul de molecule de ATP formate şi produsele finale de oxidare.

13. Care este cantitatea totală de ATP ce se descompune şi se sintetizează timp de 24 ore în organismul omului matur (2000 kcal, 70 kg)? Eficacitatea transformării produselor alimentare în energia de ATP este de 50%.

14. Care este variaţia energiei libere standard la transportul a 2ē de la NAD la O_2 în calorii sau jouli?

15. Ce se întîmplă cu energia electronilor în procesul de migrare al lor în lanţul respirator al mitocondriilor? Cîtă energie se consumă în celule la sinteza unui mol de ATP?

16. Care reacţie de oxidare din ciclul Krebs asigură intrarea electronilor în calea medie de oxidare? Cîte molecule de ATP se formează în ciclul Krebs la fosforilarea la nivel de substrat?

17. La adăugarea malonatului de sodiu la o suspensie de mitocondrii, ce are ca sursă unică de combustibil numai acidul piruvic, respiraţia lor se întrerupe brusc şi se acumulează unul din produsele metabolice intermediare:

1. Care este structura produsului intermediar acumulat?
2. De ce el se acumulează?
3. De ce se întrerupe consumarea oxigenului?
4. În ce mod se poate înlătura această inhibiţie? Explicaţi.

18. La măsurarea cantităţii de oxigen folosite de mitocondriile muşchilor porumbelului s-a observat un caz surprinzător: cantitatea de oxigen consumată a fost de 7 ori mai mare decît cea necesară pentru oxidarea completă a oxalilacetatului sau malatului pînă la CO_2 şi H_2O.

1. De ce adăugarea OA sau malatului mărește consumul de O_2 folosit?

2. De ce cantitatea de O_2 absorbit depășește de multe ori cantitatea de O_2 necesară pentru oxidarea completă a OA și malatului adăugat?

19. Ce proprietăți trebuie să posede membrana internă a mitocondriilor pentru a asigura procesele de fosforilare oxidativă?

20. În mitocondriile grăsimii brune la nou-născuți și la animalele în stare de hibernare, randamentul ATP-ului la un atom de oxigen absorbit constituie mai puțin de o moleculă:

1. Ce funcție fiziologică poate fi determinată prin așa raport mic P/O în grăsimea brună a nou-născuților?

2. Indicați mecanismele posibile care ar putea determina un astfel de raport P/O caracteristic pentru mitocondriile grăsimii brune.

CAPITOLUL IV

Chimia şi metabolismul glucidelor

Glucidele sunt compuşi polihidroxicarbonilici (aldoze şi cetoze) şi se împart în monozaharide, oligozaharide şi polizaharide. Glucide cu importanţă biologică deosebită sunt riboza, dezoxiriboza, glucoza, galactoza, manoza, lactoza, zaharoza, glicogenul ş.a.. În organism ele îndeplinesc funcţii variate: energetică, structurală etc.

Glucidele alimentare (glicogenul, amidonul, zaharoza, maltoza, lactoza) sunt hidrolizate sub acţiunea enzimelor respective (α-amilaza, zaharaza, lactaza şi maltaza) pînă la monozaharide, care străbătînd pereţii intestinului subţire, nimeresc în sânge. Acesta le transportă spre ficat, unde sunt depozitate temporar sub formă de glicogen. Ulterior, în funcţie de solicitare, sunt transportate pe cale sanguină în celulele diferitelor organe şi ţesuturi.

În celule, glucidele pot suferi diferite transformări: a) catabolice şi b) anabolice. Principalele căi de catabolizare a glucidelor în organismul vieţuitoarelor superioare şi inferioare sunt glicoliza, fermentaţiile, degradarea aerobă şi degradarea pe calea pentozofosfată.

Glicoliza anaerobă este procesul prin care o moleculă de glucoză se transformă anaerob în două molecule de acid lactic. Procesul include 11 etape catalizate de enzimele glicolitice corespunzătoare în urma cărora se eliberează 196,46 kJ, cantitate suficientă pentru sinteza a doi moli de ATP.

Unele microorganisme au capacitatea de a transforma glucoza în etanol cu eliberare de bioxid de carbon. Procesul se numeşte *fermentaţie alcoolică* şi pînă la stadiul de formare de acid piruvic se aseamănă cu glicoliza. La început acidul piruvic este decarboxilat, iar acetaldehida rezultată este redusă până la alcool etilic.

Degradarea aerobă a glucozei decurge ca faza anaerobă şi fermentaţia alcoolică pînă la stadiul de acid piruvic care se decarboxilează oxidativ. Din reacţie rezultă acetil - CoA, care intră în ciclul citratului. Din degradarea aerobă a unei molecule de glucoză rezultă 38 molecule de ATP ceea ce corespunde la 1111,8 kJ.

Importanţa căii pentozofostat constă în faptul că diverşi produşi de reacţie sau intermediarii ciclului pentozofosfat sunt implicaţi în procese de biosinteză a unor compuşi de importanţă biologică majoră. Astfel, $NADPH_2$ este

furnizorul de hidrogen în procesele de biosinteză a acizilor grași, a compușilor steroizi etc. Pentozele sunt implicate în biosinteza mononucleotidelor și respectiv a acizilor nucleici, coenzimelor.

Anabolismul glucidic include biosinteza glucozei și biosinteza oligo- și polizaharidelor. Gluconeogeneza este procesul de biosinteză a glucozei din compuși neglucidici, cum sunt aminoacizii, lactatul, piruvatul, intermediarii ciclului acizilor tricarboxilici și decurge prin simpla inversare a reacțiilor glicolitice. Deseori glucoza se formează din celelalte hexoze prin procesul de interconversie. Desfășurarea normală a metabolismului glucidic este controlată atît la nivel molecular prin intermediul enzimelor reglatoare, cît și la nivel superior de factorii de reglare cum sunt hormonii, sistemul nervos etc.

Starea de echilibru a metabolismului glucidic este indicată de concentrația glucozei în sînge (glicemie). În condiții fiziologice ea este cuprinsă între 3,33 - 5,55 mM/l.

Tulburările metabolismului glucidic se pot manifesta prin hiperglicemii sau prin hipoglicemii. În patologia metabolismului glucidic sunt întîlnite și bolile de depozitare a glicogenului, numite *glicogenoze*.

TEMA 13

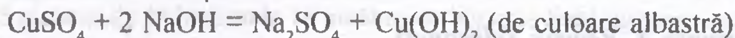
Chimia și digestia glucidelor. Metabolismul glicogenului (sinteza, mobilizarea, reglarea). Reacții de identificare a monozelor în lichidele și preparatele biologice

Experiența 1. ***Reacția Trommer.***

Principiul reacției. Monozaharidele în mediu alcalin reduc hidroxidul de cupru $Cu(OH)_2$ cu formare de oxid cupros Cu_2O, care se depune sub formă de precipitat roșu-cărămiziu.

Mecanismul reacției este următorul:

$CuSO_4 + 2\ NaOH = Na_2SO_4 + Cu(OH)_2$ (de culoare albastră)


Glucoza + $2Cu(OH)_2$ = Acid gluconic + apă + 2CuOH (de culoare galbenă).


2CuOH = apă + Cu_2O (roșu-cărămiziu).

Reacția Trommer poate fi mascată în cazul prezenței unui exces de $Cu(OH)_2$, deoarece în timpul încălzirii acesta pierde o moleculă de apă, trecînd în oxid de cupru de culoare neagră: $Cu(OH)_2 \rightarrow CuO + H_2O$

Mod de lucru. În patru eprubete numerotate se introduc cu pipeta cîte 1ml din soluţiile de glucoză, zaharoză, amidon şi urină patologică, adăugîndu-se apoi hidroxid de sodiu de 10%. Se adaugă soluţie de sulfat de cupru de 2% pînă la apariţia unei suspensii de hidroxid de cupru de culoare albastră.

Partea superioară a eprubetei, pînă la care a ajuns nivelul soluţiei, este apoi încălzită cu grijă. Apare o culoare galbenă care la încălzirea de mai departe a conţinutului eprubetei trece în roşu-cărămiziu, dovedind prezenţa zaharurilor reducătoare în soluţia analizată. Comparaţi rezultatele reacţiei de culoare obţinute şi explicaţi prezenţa sau absenţa precipitatului roşu-cărămiziu.

Experienţa 2. ***Reacţia Fehling.***

Principiul reacţiei zaharurilor reducătoare cu licoarea Fehling este acelaşi ca cel descris mai sus pentru reacţia Trommer.

Licoarea Fehling este o soluţie în compoziţia căreia intră sulfatul de cupru, hidroxidul de sodiu şi tartratul dublu de sodiu şi potasiu în proporţii determinate. Tartratul dublu de sodiu şi potasiu menţine hidroxidul de cupru în soluţie. De aceea la fierberea licorii Fehling nu se poate observa apariţia oxidului de cupru de culoare neagră.

Mod de lucru. În patru eprubete numerotate se pun cu pipeta cîte 1ml din soluţiile de glucoză, zaharoză, amidon şi urină patologică, adăugîndu-se în toate cîte 1ml de licoare Fehling. Conţinutul eprubetelor se încalzeşte pînă la fierbere. Se notează şi se explică rezultatele reacţiei cu licoarea Fehling.

Experienţa 3. ***Reacţia Nylander.***

Principiul reacţiei. În prezenţa unui zahăr reducător, sarea de bismut la cald este redusă pînă la bismut metalic de culoare neagră.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se pune cu pipeta 1ml soluţie de glucoză şi se adaugă 1ml soluţie Nylander şi 2 ml de apă distilată. Amestecul se încălzeşte pînă la fierbere. La începutul fierberii apare un precipitat brun, care trece repede în negru.

Experienţa 4. ***Reacţia Seliwanoff.***

Principiul reacţiei. Cetozele (fructoza), prin încalzire în prezenţa acidului clorhidric şi a rezorcinei, colorează soluţia în roşu-vişiniu sau în roşu. Fructoza prin încălzire în mediu puternic acid pierde trei molecule de apă, transformîndu-se în oximetilfurfurol. Acesta reacţioneaza cu rezorcina formînd un compus colorat în roşu-vişiniu sau roşu.

Mod de lucru. În două eprubete se pun cu pipeta 1ml soluţie Seliwanoff la care în prima eprubetă se adaugă 2-3 picături soluţie de fructoză, iar în a doua - 2-3 picături soluţie de glucoză. Eprubetele se încălzesc. Se notează şi se explică rezultatele reacţiilor.

Experienţa 5. ***Digestia glucidelor în tractul gastrointestinal.***

Experienţa se realizează conform schemei de mai jos. Se notează coloraţia în fiecare eprubetă şi se explică rezultatele reacţiei cu licoarea Fehling luînd în considerare acţiunea enzimelor ce se conţin în sucul gastric, salivă, pancreatinei asupra amidonului şi zaharozei.

Experienţa 6. ***Hidroliza amidonului în mediu acid.***

Principiul reacţiei. Amidonul nu posedă proprietăţi reducătoare, însă la fierbere cu HCl concentrat el se scindează cu formarea la început a dextrinelor (produse intermediare), apoi a maltozei şi în sfîrşit a glucozei, care posedă proprietaţi redox.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se introduc 3-4 ml soluţie de amidon de 1% şi cîteva picături de HCl concentrat. Conţinutul eprubetei se agită şi se fierbe. După 1-2 minute de la începutul fierberii se iau 5-10 picături de hidrolizat într-o eprubetă, unde din timp se introduc 5 ml H_2O şi apoi 2 picături soluţie Lugol (I_2 în KI). Apare o culoare violetă ce indică prezenţa I_2 dextrine – amilodextrine. Eprubeta cu amidon şi acid se încălzeşte în continuare şi peste 1-2 min repetăm proba cu iodul – apare o culoare roşie-brună, ce indică prezenţa eritrodextrinelor. Peste 2-3 min se repetă reacţia cu iodul – apare o coloraţie galbenă (culoarea iodului în apă), caracteristică pentru acrodextrine. Amidonul se hidrolizează mai departe pînă la maltoză şi glucoză, reacţia cu iodul este negativă. Conţinutul eprubetei se colorează în galben, ceea ce indică sfîrşitul hidrolizei.

Hidrolizatul obţinut se neutralizează cu 2-3 picături de NaOH de 10 % pînă la mediu bazic (după hîrtia de turnesol), se adaugă licoarea Fehling (în raport de: 5 picături de hidrolizat la 15 picături de licoarea Fehling) şi se încălzeşte pînă la fierbere. Apare un sediment galben de CuOH, care trece în roşu-cărămiziu (Cu_2O). Aceasta ne dovedeşte prezenţa glucozei care posedă proprietăţi reducătoare.

№ d/o	Amidon (ml)	Zaharoză (ml)	Salivă (ml)	Suc gastric (ml)	Pancreatină (ml)	Baie de apă	Licoarea Fehling (ml)	Culoarea
1	1,0	-	1,0	-	-		1,0	
2	1,0	-	-	1,0	-		1,0	
3	1,0	-	-	-	1,0		1,0	
4	-	1,0	1,0	-	-	37°C	1,0	
5	-	1,0	-	1,0	-	10	1,0	
6	-	1,0	-	-	1,0	min	1,0	

Experienţa 7. ***Determinarea activităţii α-amilazei salivare. Metoda Volghemut.***

Principiul metodei. Metoda se bazează pe determinarea cantităţii minime de amilază care degradează complet amidonul adăugat. Activitatea α-amilazei salivare se exprimă în mililitri de soluţie de amidon de 0,1%, care sunt descompuşi de l ml salivă nediluată în decurs de 30 min la 38°C. În salivă activitatea amilazei variază între 160 şi 320. Această metodă este utilizată pe larg la dozarea activităţii amilazei în urină şi sînge.

Mod de lucru. În şase eprubete numerotate se pun cu pipeta cîte 1 ml de apă. În prima eprubetă se adaugă 1 ml de salivă diluată de 10 ori. Conţinutul primei eprubete se agită trăgînd şi dînd drumul lichidului din pipetă. Se iau cu pipeta 1 ml amestec şi se trece în eprubeta a doua. Conţinutul acestei eprubete se agită şi 1 ml de amestec se trece în a treia. Acest procedeu se repetă pînă la ultima eprubetă, din care 1 ml de amestec se varsă. În toate eprubetele se adaugă cîte 2 ml soluţie de amidon de 0,1%, eprubetele se agită şi se instalează în baia de apă la 38°C pentru 30 minute. După incubare, eprubetele se răcesc într-un şuvoi de apă de robinet şi se adaugă în fiecare cîte o picătură soluţie de iod de 0,1% şi se agită. Se notează coloraţia amestecului din fiecare eprubetă.

Calculul. Se notează eprubeta în care s-a produs hidroliza completă a amidonului de către cantitatea minimă de amilază. După cantitatea de salivă nediluată din această eprubetă se face calculul activităţii amilazei salivare conform următoarelor proporţii. A ml salivă diluată scindează 2 ml soluţie de amidon de 0,1%, iar 1 ml de salivă nediluată scindează X ml soluţie de amidon de 0,1%. Diluţia salivei este următoarea: prima eprubetă - 1:20, eprubeta a doua - 1:40, eprubeta a treia – 1:80 etc.

Teme pentru autopregătire

1. Rolul biologic al glucidelor. Clasificarea glucidelor.

2. Monozaharidele. Clasificarea lor. Importanța și structura celor mai importante trioze, pentoze și hexoze.

3. Structura glucozei (formula deschisă, proecția Haworth, conformația scaun). D- și L-glucoza, anomerii și epimerii glucozei.

4. Reacțiile chimice importante ale monozaharidelor (formarea O- și N-glicozodelor, derivaților fosforilați, aminoglucidelor, acizilor aldonici și uronici).

5. Structura și proprietățile dizaharidelor (maltozei, lactozei și zaharozei).

6. Structura și proprietățile polizaharidelor (amidonului, glicogenului și celulozei).

7. Digestia și absorbția glucidelor în tractul gastrointestinal.

8. Metabolismul glicogenului (sinteza, mobilizarea, reglarea).

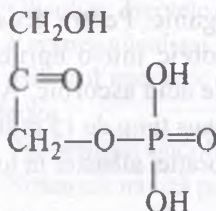
9. Principiul reacțiilor de identificare a monozaharidelor în lichidele biologice.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

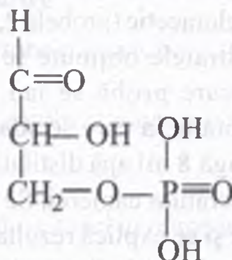
1. Zaharoza nu se prezintă sub două forme anomere. De ce?

2. Care este singura deosebire de structură dintre amidon și celuloză? Cum se răsfrînge această deosebire asupra proprietăților acestor polizaharide?

3. Mai jos sunt date formulele a două substanțe. Care din afirmațiile enumerate sunt juste și care nu?



A



B

a) A este un alcool primar, iar B – alcool secundar;

b) A este o cetonă, iar B - o aldehidă;

c) A și B sunt enantiomeri;

d) A şi B nu sunt enantiomeri, ci ambele sunt optic active;

e) A şi B sunt fosfotrioze.

4. Rumegătoarele utilizează celuloza ca hrană, iar majoritatea mamiferelor nu o pot utiliza. Explicaţi de ce.

TEMA 14

Glicoliza. Reglarea. Soarta piruvatului în diferite condiţii. Fermentaţia alcoolică. Gluconeogeneza: mecanismul, reglarea

Experienţa 1. ***Utilizarea fosforului anorganic în procesul de fermentaţie alcoolică.***

Principiul reacţiei. Dacă în proba luată pînă la începerea fermentaţiei şi în trei probe luate după începerea fermentaţiei se efectuează reacţia molibdenică de identificare a acidului fosforic, atunci se observă că intensitatea culorii albastre descreşte de la prima probă spre ultima. Aceasta are loc din cauza că fosfatul anorganic este folosit permanent în procesul de fermentaţie alcoolică la formarea 1,3 - difosfogliceratului şi cantitatea lui în mediu se reduce treptat.

Mod de lucru. În 4 eprubete numerotate se pune cu pipeta cîte 1 ml soluţie de acid tricloracetic de 10%. Se mărunţeşte 1 g drojdii de bere uscată cu un 1 g glucoză sau zaharoză, 5 ml soluţie de fosfaţi şi se agită. 1 ml de amestec se trece în prima eprubetă. Eprubeta cu restul amestecului se pune într-o baie de apă la t = 37°C. După 30, 60 şi 90 minute de la începutul fermentaţiei se iau cîte 1 ml de amestec şi se trec în eprubetele cu acid tricloracetic (probele 2, 3 şi 4). Amestecul din fiecare probă se filtrează şi în filtratele obţinute se identifică fosforul anorganic. Pentru aceasta din fiecare probă se iau cîte 0,5 ml filtrat neproteic într-o eprubetă numerotată, la care se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de acid ascorbic. Apoi se adaugă 8 ml apă distilată, se agită şi se lasă în repaus timp de 15 minute la temperatura camerei. Se compară intensitatea coloraţiei albastre în toate probele şi se explică rezultatele obţinute.

Experienţa 2. ***Determinarea activităţii fructozo-1,6-difosfataldolazei din serul sanguin.***

Principiul metodei. Fructozo-1,6-difosfataldolaza catalizează reacţia de scindare a fructozo-1,6-difosfatului (FDP) în două fosfotrioze -

dihidroxiacetonfosfat şi gliceraldehidă-3-fosfat, care formează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina o hidrazonă, colorată în mediu alcalin în violet. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu activitatea enzimei în eşantionul analizat.

Mod de lucru. În două eprubete (proba de cercetat şi proba de control) se pun cu pipeta cîte 0,1 ml ser sangvin. În proba de cercetat se adaugă 0,2 ml amestec nr. 2 (conţine hidrocarbonat de sodiu, hidrazinsulfat, acid monoiodacetic, FDP şi apă), iar în proba de control - 0,175 ml de amestec nr. 1 (conţine aceleaşi componente în afară de FDP). Ambele eprubete se introduc într-o baie de apă pentru o oră la t = 37°C. După incubare, în proba de control se adaugă cîte 0,3 ml soluţie de acid tricloracetic de 10% şi 0,6 ml soluţie de hidroxid de sodiu de 3%. Probele se lasă în repaus timp de 10 minute la temperatura camerei. Apoi se adaugă cîte 0,6 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină şi din nou se lasă în repaus timp de 10 minute. După aceasta în fiecare eprubetă se introduc cîte 4,2 ml soluţie de hidroxid de sodiu de 3% şi probele se citesc imediat la fotocolorimetru contra apei (cuva - 5 nm, filtrul de lumină verde). Din indicaţia probei de analizat se scade indicaţia probei de control. Activitatea fructozo-1,6-difosfataldolazei se exprimă în unităţi convenţionale, care prezintă valoarea extincţiei multiplicată cu 100. În condiţii normale, activitatea aldolazei constituie 3 - 8 unităţi.

Valoarea diagnostică. Creşterea activităţii aldolazei din serul sanguin se observă în distrofia musculară, hepatitele toxice şi infecţioase, pancreatita acută, infarctul miocardic.

Teme pentru autopregătire

1. Glicoliza. Treptele enzimatice ale glicolizei aerobe şi anaerobe.
2. Reglarea glicolizei.
3. Bilanţul energetic al degradării anaerobe şi aerobe a glucozei. Soarta piruvatului.
4. Fermentaţia alcoolică.
5. Sistemele navetă pentru transferarea NADH din citozol în mitocondrii.
6. Gluconeogeneza (mecanismul, reglarea).
7. Procesul de sinteză şi reglare a lactozei.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Scrieţi reacţiile glicolizei anaerobe în care se formează ATP prin fosforilare la nivel de substrat.

2. Numiţi enzimele glicolizei care se referă la oxido-reductaze, transferaze şi liaze.

3. Scrieţi reacţiile de transfomare ulterioară a piruvatului.

4. Scrieţi reacţiile degradării glucozei începînd cu dihidroxiacetonfosfatul şi terminînd cu 1,3-difosfoglicerat. Care este soarta hidrogenului scindat în condiţiile aerobe şi anaerobe de degradare a glucozei?

5. Cîte molecule de ATP se generează prin fosforilare la nivel de substrat la degradarea completă aerobă a unei molecule de glucoză?

6. Scrieţi reacţiile sistemelor navetă glicerolfosfat şi malat.

7. Cîte molecule de ATP se generează la oxidarea completă pînă la CO_2 şi H_2O a unei molecule de lactat?

8. Care este soarta acidului lactic?

9. Scrieţi reacţiile de obţinere a alcoolului etilic din lactat.

10. Calculaţi numărul de molecule de ATP şi CO_2 care se eliberează la fermentaţia alcoolică a zaharozei.

11. Gluconeogeneza. Reacţiile ireversibile ale glicolizei şi inversarea lor în cazul gluconeogenezei.

12. Cum influenţează majorarea concentraţiei de ATP şi AMP asupra activităţii fosfofructokinazei?

13. În baza reacţiilor enzimatice cunoscute, indicaţi care din substanţele numite sunt formatoare de glicogen: a) succinat; b) glicerol; c) acetil-CoA; d) piruvat; e) butirat?

14. În ce punct se produce reglarea sintezei glicogenului?

15. Reieşind din procesul de sinteză a glicogenului, determinaţi numărul de molecule de ATP care se consumă la transformarea glucozo-6-fosfatului în glicogen. Cîte procente constituie acest număr din numărul maxim de molecule de ATP formate la degradarea completă a glucozo-6-fosfatului?

TEMA 15

Calea pentozofosfat de degradare a glucozei. Includerea altor monozaharide (fructoza, galactoza) în secvenţa glicolitică. Reglarea şi patologia metabolismului glucidic. Diabetul zaharat. Insulina şi mecanismele ei de acţiune. Reglarea nivelului de glucoză în sînge

Experienţa 1. ***Determinarea piruvatului în urină.***

Principiul metodei. Piruvatul în mediul alcalin reacţionează cu 2,4-dinitrofenilhidrazina acidului piruvic de culoare galbenă-oranj. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu concentraţia de acid piruvic şi se determină pe cale colorimetrică.

Mod de lucru. În prima eprubetă (proba de analizat) se pune cu pipeta 1 ml de urină, iar în a doua (proba de control) - 1 ml de apă. Apoi în ambele eprubete se adaugă cîte 1 ml soluţie alcoolică de hidroxid de potasiu de 2,5%, se agită un minut, după ce se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină de 0,1%. Conţinutul eprubetei din nou se agită şi se lasă în repaus timp de 15 minute la temperatura camerei. Se determină valoarea E a probei de analizat la FEC contra probei de control (cuva - 5 mm, filtrul de lumină albastră). Conţinutul de acid piruvic în proba de analizat se determină cu ajutorul curbei-etalon.

Valoarea diagnostică. Zilnic cu urina se excretă 113,7-283,9 mM (10-25 mg) de acid piruvic. Conţinutul acidului piruvic creşte în sînge şi în urină în insuficienţă de tiamină în organism, în diabetul zaharat, în hiperfuncţia sistemului hipofizo-suprarenal, în cazurile de administrare a unor medicamente – adrenalinei, stricninei, camforului.

Experienţa 2. ***Determinarea glucozei în sînge. Metoda o-toluidinică.***

Principiul metodei. La fierberea glucozei cu o-toluidină (metilanilină) în soluţia de acid acetic se formează un complex de culoare verde. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu cantitatea de glucoză şi se determină prin fotocolorimetrare.

Mod de lucru. În două eprubete de centrifugare se pun cu pipeta cîte 0,9 ml soluţie de acid tricloracetic de 3%. În prima eprubetă (proba de analizat) se adaugă 0,1 ml sînge sau ser sanguin, iar în a doua (proba standard) - 0,1 ml soluţie standard de glucoză (5 mM/l). Conţinutul eprubetelor se agită şi se centrifughează la 3000 rotaţii/minut în decurs de 10 minute. Supernatantul

este decantat. Pentru determinarea glucozei se iau cîte 0,5 ml supernatant din fiecare eprubetă, se introduc în eprubete uscate obişnuite şi se adaugă cîte 4,5 ml reactiv o-toluidinic. Eprubetele se introduc într-o baie de apă clocotindă exact pentru 8 minute, după ce se răcesc într-un jet de apă de robinet. Probele sunt citite la fotocolorimetru contra apei (cuva - 10 mm; filtrul de lumină roşie).

Calculul se efectuează după formula:

$$C^{an} = \frac{C^{st} E^{an}}{E^{st}},$$

unde: C^{an} - concentraţia glucozei în proba de analizat;
C^{st} - concentraţia de glucoză în proba standard (5 mM / l);
E^{an} - densitatea optică a probei de analizat;
E^{st} - densitatea optică a probei standard.

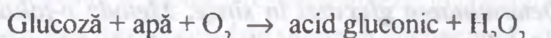
În normă cantitatea de glucoză din sînge determinată prin metoda o-toluidinică variază între 3,33 - 5,55 mM/l.

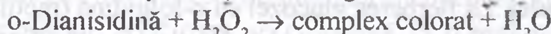
Valoarea diagnostică. Hiperglicemia se întîlneşte la pacienţii cu diabet zaharat, pancreatită acută, în cazurile de excitaţie a sistemului nervos central, în hiperfuncţia hipofizei, glandelor suprarenale şi tiroidei.

Hipoglicemia se întîlneşte în hipofuncţia glandelor endocrine enumerate mai sus, în hiperfuncţia insulelor Langerhans, la supradozarea insulinei, în bolile de rinichi cînd este dereglat procesul de reabsorbţie al glucozei.

Experienţa 3. *Determinarea conţinutului de glucoză în lichidele biologice (ser, urină, etc). Metoda enzimatică.*

Principiul metodei. Glucoza este oxidată enzimatic de către glucozo-oxidaza până la acid gluconic. Din reacţie rezultă peroxid de hidrogen, care oxidează o-dianisidina până la un complex colorat în galben-brun. Intensitatea coloraţiei este proporţională cu concentraţia glucozei şi se măsoară fotocolorimetric.


Glucoză + apă + O_2 $\rightarrow$ acid gluconic + H_2O_2


o-Dianisidină + H_2O_2 $\rightarrow$ complex colorat + H_2O

Mod de lucru. Dozarea propriu-zisă se efectuează conform tabelului:

Reactivi (ml)	Proba (A_1)	Etalon (A_2)	Control
Ser	0,01	-	-
Sol. de glucoză	-	0,01	-
Apă distilată	-	-	0,01
Reactiv glucozic	3,00	3,00	3,00

Eprubetele se agită, apoi se introduc în baia de apă (37°C) pentru 30 minute (sau se lasă la temperatura camerei timp de o oră). După expirarea timpului se măsoară densitatea optică a probei A_1 şi a probei etalon A_2 faţă de control (filtrul de lumină verde, cuva de 10 mm).

C a l c u l u l: Glucoza (mM/l) = 10 x A_2/A_1.

Valorile normale: 3,3 - 5,5 mmol/l.

Teme pentru autopregătire

1. Calea pentozofosfat de degradare a glucozei.
2. Antrenarea altor glucide, în afară de glucoză, în reacţia glicolitică (fructoza, galactoza, manoza).
3. Reglarea metabolismului glucidic la nivelul celulei, organelor şi întregului organism.
4. Investigaţia funcţiei glicoreglatoare a organismului (hiperglicemie provocată, hiperglicemia provocată dublă şi proba funcţională cu galactoză).
5. Perturbările metabolismului glucidelor: a) hiperglicemia, hipoglicemia şi glucozuria; b) diabetul zaharat: dereglările metabolismului glucidic, lipidic, proteic şi hidrosalin. Mecanismul de acţiune al insulinei; c) bolile moleculare legate de tulburările metabolismului glucidic (galactozemia, fructozuria, intoleranţa lactozei, glicogenozele şi aglicogenozele); d) dereglarea metabolismului glucidic în stările hipoxice.
6. Diabetul zaharat. Insulina – structura şi mecanismele de acţiune.
7. Reglarea nivelului de glucoză în sînge.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Scrieţi ecuaţia stoichiometrică pentru sinteza ribozo-5-fosfatului din glucozo-6-fosfat fară generarea simultană de NADPH.
2. Scrieţi ecuaţia stoichiometrică de sinteză a NADPH din glucozo-6-fosfat fară generarea simultană de pentoze.
3. Glucoza marcată cu C_{14} la atomul C_6 a fost adăugată la o soluţie, care conţine enzimele şi cofactorii căii pentozofosfat. Care este soarta izotopului radioactiv?
4. Care reacţie a ciclului Krebs este analoagă cu reacţia de decarboxilare a fosfogluconatului?
5. Care produse se acumulează în sînge şi ţesuturi în insuficienţa de

galactokinază şi galactozo-1-fosfaturidiltransferază în cele două tablouri clinice de galactozemie?

6. Mecanismul de acţiune al insulinei (indicaţi răspunsul corect): a) stimulează procesul de transport activ al glucozei şi aminoacizilor în ţesuturi; b) exercită acţiune activatoare asupra sintetazei acizilor graşi; c) inhibă enzimele gluconeogenezei; d) intensifică glicogenoliza în ficat; e) intensifică lipoliza.

7. Care din enzimele enumerate mai jos sunt activate sau inhibate de insulină: a) hexokinaza; b) glucokinaza; c) fosfofructokinaza; d) glicogensintetaza; e) glicogenfosforilaza; f) piruvatcarboxilaza.

8. Acţiunea cărora dintre hormonii enumeraţi este îndreptată spre creşterea conţinutului de glucoză în sînge: a) glucagonului; b) insulinei; c) adrenalinei; d) adrenocorticotropinei; e) hidrocortizonului?

9. Pentru boala ereditară de depozitare a glicogenului – afecţiunea von Hirke – este caracteristic: a) conţinut redus de glucoză în sînge după 6 ore de inaniţie; b) depozitare exagerată de glicogen în ficat; c) activitate înaltă a glucozo-6-fosfatazei hepatice; d) creşterea nivelului de acid lactic în sînge; e) hipolipimie.

TEMA 16

Colocviu la temele:
Metabolismul general. Chimia şi metabolismul glucidelor

CAPITOLUL V

Chimia şi metabolismul lipidelor

Se numesc lipide substanţele organice insolubile sau puţin solubile în apă, dar solubile în solvenţi nepolari: eter, cloroform, benzen etc. Acest grup include numeroase şi variate substanţe cu funcţii importante în organismul viu, inclusiv în cel uman. Ele sunt elemente structurale ale membranelor biologice şi determină permeabilitatea lor, contribuie la comunicarea şi adeziunea intercelulară, participă la generarea şi transmiterea impulsului nervos. Acilgliceridele ţesutului adipos reprezintă forma majoră de depozitare a combustibilului biologic. La degradarea unui gram de lipide se obţin 9,3 kcal (mai mult decît la oxidarea unei cantităţi echivalente de glucide sau proteine). Hormonii, vitaminele şi substanţele biologic active de natură lipidică reglează procesele metabolice şi fiziologice. Datorită proprietăţilor sale fizico-chimice, lipidele asigură hidro-, termo- şi electroprotecţia organismelor vii.

Lipidele se clasifică în dependenţă de structura chimică, proprietăţile fizico-chimice şi rolul lor. După structură, deosebim monomeri lipidici (aldehide, cetone, alcooli, aminoalcooli superiori, izoprenoizi şi derivaţii lor, acizi graşi) şi lipide policomponente, care la rîndul lor se divid în simple şi compuse. Lipidele policomponente simple sunt esterii alcoolilor şi acizilor graşi (cerurile, acilgliceridele). În componenţa celor compuse distingem şi alte substanţe: acid fosforic (fosfogliceridele), sfingozina (sfingolipide), mono- şi oligozaharide (glicolipide).

În organism lipidele se găsesc în trei forme: a) lipidele structurale sau protoplasmatice care sunt părţi componente ale membranelor biologice; b) lipidele de rezervă depozitate în ţesutul adipos şi care constituie o importantă sursă energetică; c) lipidele plasmatice – forma de transport a lipidelor.

Necesarul zilnic de lipide este în medie de 80 g, incluzînd grăsimi atît de origine animală, cât şi vegetală. Lipidele alimentare sunt sursa vitaminelor liposolubile (A, D, E, K) şi a acizilor graşi indispensabili – linolic şi linolenic.

Digestia şi absorbţia lipidelor alimentare este un proces complex, ce decurge în intestinul subţire şi care necesită prezenţa bilei, sucului pancreatic şi a enzimelor lipolitice. Acizii biliari, compuşii majori ai bilei, contribuie

la emulsionarea lipidelor alimentare, activizarea enzimelor lipolitice şi absorbţia produselor finale ale digestiei. Bicarbonaţii sucului pancreatic crează pH-ul optim enzimelor lipolitice. Principalele enzime lipolitice sunt lipaza, fosfolipazele, colesterolesteraza, sfingomielinaza şi ceramidaza. Produsele finale ale digestiei lipidelor alimentare sunt absorbite prin difuzie simplă şi difuzie sau pinocitoză micelară.

Din substanţele, ce se absorb din lumenul intestinului în enterocite, se resintetizează lipide specifice organismului omului, transportate spre alte ţesuturi şi organe ce le utilizează.

Metabolismul intermediar al lipidelor include un număr considerabil de căi catabolice şi anabolice. Degradarea lipidelor policomponente constă în formarea unei cantităţi semnificative de acizi graşi. β-oxidarea lor are loc în matricea mitocondrială şi duce la formarea acetil-CoA, $FADH_2$ şi $NADH{\bullet}H^-$. Oxidarea lor ulterioară în ciclul Krebs şi lanţul respirator este cuplată cu degajarea energiei şi biosinteza ATP-ului. Numărul moleculelor de ATP sintetizate este proporţional lungimii catenei hidrocarbonice a acidului gras şi este semnificativ mai mare decît în cazul oxidării monozaharidelor sau aminoacizilor.

Biosinteza majorităţii claselor de lipide necesită formarea în prealabil a acizilor graşi. Ea are loc în citozol din acetil-CoA cu participarea $NADPH{\cdot}H^+$. Sursele de $NADPH{\cdot}H^-$ sunt ciclul pentozofosfaţilor de oxidare a glucozei şi sistemul navetă citrat de transfer a acetil-CoA. Acetil-CoA şi $NADPH{\bullet}H^-$ sunt de asemenea necesare pentru biosinteza colesterolului şi derivaţilor lui (acizilor biliari, vitaminei D, hormonilor steroizi). În condiţii fiziologice o cantitate neînsemnată de acetil-CoA este folosită în ficat pentru biosinteza corpilor cetonici - acetonei, acizilor acetoacetic şi α-hidroxibutiric, concentraţia sanguină a cărora este mică şi constantă. Dacă se acumulează cantităţi importante de acetil-CoA, se intensifică biosinteza corpilor cetonici şi ca urmare creşte concentraţia lor sanguină (cetonemie). De asemenea, ei încep să se elimine cu urina (cetonurie).

Dereglările metabolismului lipidic se manifestă prin modificări cantitative şi calitative ale lipidelor sanguine – hiperlipemii sau ale ţesuturilor – lipidoze tisulare. Deosebim hiperlipemii ereditare sau primare şi secundare, ce însoţesc alte afecţiuni (diabetul zaharat, alcoolismul etc.). Cele mai frecvent întîlnite lipidoze tisulare sunt obezitatea, ateroscleroza şi litiaza biliară.

TEMA 17

Lipidele – clasificarea, structura, proprietăţile fizico-chimice, rolul biologic

Experienţa 1. ***Determinarea conţinutului lipidelor totale în serul sanguin.***

Lipidele totale includ: triacilglicerolii, acizii graşi liberi, fosfolipidele, colesterolul, lipoproteidele.

a) *Cu reactivul fosfovanilinic.*

Principiul metodei. Lipidele serului sanguin sunt hidrolizate cu ajutorul acidului sulfuric concentrat. Produşii degradării lipidelor interacţionează cu reactivul fosfovanilinic, constituit din vanilină şi acid fosforic, formînd un compus de culoare roşie. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu cantitatea lipidelor din serul sanguin.

Mod de lucru. Determinarea lipidelor se efectuează conform tabelului:

Reactivi	Proba	Etalon	Soluţia de comparaţie
Ser sanguin (ml)	0,02	-	-
Soluţie etalon (ml)	-	0,02	-
H_2SO_4 concentrat (ml)	1,50	1,50	1,50
Hidrolizat (ml)	0,1	0,1	0,1
Reactiv fosfovanilinic (ml)	1,50	1,50	1,50

Eprubetele se fierb 15 minute în baia de apă în clocot (are loc hidroliza lipidelor), ulterior se răcesc. În trei eprubete uscate se trec cîte 0,1 ml hidrolizat şi se adaugă cîte 1,5 ml reactiv fosfovanilinic (vezi tabelul). Conţinutul eprubetelor se amestecă şi peste 40-50 minute se măsoară densitatea optică a probei şi etalonului faţă de soluţia de comparare (FEC, filtrul de lumină verde, cuva de 10 mm).

Conţinutul lipidelor X (g/l) se determină după formula: X= A/B · 8,

unde: A – densitatea optică a probei;

B – densitatea optică a etalonului;

8 – concentraţia lipidelor în etalon (g/l).

Reactiv fosfovanilinic (acid fosforic 11,8 M, vanilină 13 mM).

Prepararea reactivului fosfovanilinic: se dizolvă 0,495 vanilină în 50 ml de apă, se adaugă 170 ml acid fosforic (d = 1,7) şi se completează la 250 ml cu apă. Se amestecă bine.

b) *Prin metoda nefelometrică.*

Principiul metodei. Lipidele extrase cu amestec etanol-eter (3:1) interacţionează cu acidul sulfuric şi formează o emulsie, densitatea optică a căreia este proporţională cantităţii lipidelor şi se măsoară fotoelectro-colorimertric (nefelometric).

Mod de lucru. În eprubetă se introduc 0,2 ml ser sanguin şi 3,8 ml amestec etanol-eter. Eprubeta se agită, se introduce în baia de apă la temperatura de 50-70°C şi se lasă pînă conţinutul ei începe să fiarbă. După răcire soluţia se filtrează în eprubete cotate (4 ml). Volumul filtratului se completează cu amestec etanol-eter pînă la 4 ml. În altă eprubetă se trec 2 ml de extract obţinut (corespunde la 0,1 ml ser sanguin) şi se adaugă 10 ml soluţie de acid sulfuric de 1%. Proba se introduce în baia de apă în clocot pentru 1 minut, apoi se răceşte şi peste o oră se măsoară densitatea optică la FEC (filtrul de lumină roşie, cuva de 10 mm) faţă de soluţia martor (2 ml amestec etanol-eter şi 10 ml soluţie acid sulfuric de 1%).

Calculul se efectuează după curba-etalon.

Valorile normale constituie 4–8 g/l.

Importanţa clinică. Conţinutul lipidelor în serul sanguin se majorează (hiperlipemie) în diabet zaharat, nefroze, ciroza biliară, obezitate, ateroscleroză etc. Hiperlipemie fiziologică se constată peste 1–4 ore după luarea mesei (hiperlipemie postprandială).

Experienţa 2. ***Determinarea conţinutului triacilglicerolilor în serul sanguin.***

Principiul metodei. Triacilglicerolii, saponificîndu-se cu KOH, eliberează glicerolul, care este oxidat pînă la formaldehidă. Aceasta interacţionează cu acetilacetona, formînd un compus de culoare verde–galbenă. Intensitatea coloraţiei este proporţională cantităţii TAG şi se măsoară fotoelectrocolorimetric.

Mod de lucru. Experienţa se efectuează conform schemei în eprubetele de centrifugare.

Reactivi (ml)	Proba (ml)	Etalon (ml)	Martor (ml)
Apă distilată	-	-	0,1
Soluţie etalon	-	0,1	-
Ser sanguin	0,1	-	-
Izopropanol	4,0	4,0	4,0

Eprubetele se agită şi în fiecare se introduce cu o linguriţă gradată cîte 0,4 mg de absorbant. Eprubetele se agită timp de 10-15 minute şi se centrifughează 5 minute la 3000 turaţii/minut. În alte eprubete uscate se introduc:

Supernatant (ml)	2,0	2,0	2,0
Soluţie de KOH (ml)	0,5	0,5	0,5

Eprubetele se agită, apoi se închid cu dopuri şi se incubează 10 minute în baia de apă la 60°C. După incubare, eprubetele se răcesc şi în fiecare se adaugă cîte 0,5 ml soluţie oxidantă. Soluţiile se amestecă şi se lasă 10 minute la temperatura camerei. Ulterior, în fiecare eprubetă se adaugă cîte 0,5 ml soluţie de acetilacetonă, conţinutul se amestecă şi eprubetele se pun la incubare în baia de apă pe 30 minute la 60°C. După răcire, se măsoară densitatea optică a probei de experienţă şi probei etalon faţă de martor în cuve de 10 mm (filtrul de lumină violetă).

Calcularea conţinutului de triacilgliceroli se face după formula:

$$C_{\delta} = \frac{E_{exp.} \cdot C_{st}}{E_{st}}, \qquad \text{unde } C_{st.} = 3{,}39 \text{ mM/l}.$$

Valorile normale constituie 0,4-1,86 mM/l.

Importanţa clinică. Conţinutul triacilglicerolilor în serul sanguin se măreşte în diabetul zaharat, nefroze, hipotiroidism, afecţiuni hepatice. Scăderea conţinutului se constată în hipertiroidism.

Notă: În fiecare grupă se vor efectua cîte 2 probe etalon şi martor.

Teme pentru autopregătire

1. Funcţiile biologice ale lipidelor.

2. Clasificarea lipidelor (structurală, funcţională, după proprietăţile fizico-chimice).

3. Lipidele de rezervă. Reprezentanţii, structura, proprietăţile fizico-chimice, rolul biologic.

4. Lipidele protoplasmatice – fosfogliceridele, sfingolipidele, glicolipidele, colesterolul – structura, proprietăţile fizico-chimice, rolul biologic.

5. Lipidele sanguine. Lipoproteidele plasmei. Tipurile, compoziţia chimică (lipidele şi apoproteidele), rolul biologic.

6. Eicosanoizii – prostaglandinele, leucotrienele, tromboxanii – structura şi rolul biologic.

7. Vitaminele liposolubile – A,D,E, K – structura şi rolul biologic.

8. Membranele biologice.

- Funcţiile.
- Structura – modelul S.G.Sanger şi G.L.Nicolson.
- Proprietăţile fundamentale – fluiditatea, motilitatea, permeabilitatea selectivă, asimetria, autoasamblarea şi autorepararea.
- Diversitatea şi specificitatea structurilor şi funcţiilor diferitor membrane biologice.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Care acizi graşi se întîlnesc cel mai frecvent în ţesutul adipos uman? Scrieţi structura lor. Cărei clase de acizi graşi aparţine fiecare? Ce proprietăţi fizico-chimice posedă? Ce proprietăţi conferă lipidelor din componenţa cărora fac parte?

2. Cantitatea căror lipide – de rezervă sau protoplasmatice: a) variază în limite mari; b) este practic constantă în organismul uman? Explicaţi, de ce.

3. De ce lipidele sunt sursa energetică principală în organismul omului?

4. Scrieţi formulele următoarelor lipide şi indicaţi grupele hidrofobe şi hidrofile din componenţa lor. Care din ele posedă sarcină?

a) Fosfatidilcolinele;
b) Fosfatidiletanolaminele;
c) Fosfatidilserinele;
d) Sfingomielinele;
e) Cerebrozidele;
f) Gangliozidele;
g) Colesterolul.

5. Între lipidele şi proteinele membranelor biologice se formează preponderent legături:

a) hidrofobe; b) de hidrogen; c) covalente; d) ionice; e) eterice şi esterice.

6. Membranele căror organite celulare sunt formate dintr-un singur strat de lipide? Cum se reflectă această particularitate structurală asupra proprietăţilor lor?

7. Care sunt deosebirile dintre membranele citoplasmatice ale unei celule normale şi ale unei celule canceroase?

TEMA 18

Digestia şi absorbţia lipidelor în tractul gastrointestinal. Catabolismul tisular al lipidelor

Experienţa 1. *Acţiunea fosfolipazelor pancreatice.*

Principiul metodei. Fosfolipazele pancreatice scindează fosfolipidele alimentare pînă la acizi graşi, glicerol, acid fosforic şi substanţe azotate. Acţiunea lor poate fi apreciată după apariţia acidului fosforic liber ce se identifică prin reacţia molibdenică (acidul fosforic la încălzirea cu molibdatul de amoniu formează precipitatul galben de fosfomolibdat de amoniu).

Mod de lucru. În două eprubete se introduc cîte 5 picături de suspensie de gălbenuş de ou. În prima se adaugă 2 picături de soluţie de pancreatină, iar în a doua (martor) - 2 picături de apă. Eprubetele se incubează la 38°C timp de 30 minute. După incubare, în ambele eprubete se introduc cîte 5 picături de reactiv molibdenic. Eprubetele se încălzesc la flacără, după ce se răcesc. Observăm apariţia precipitatului de culoare galbenă.

Experienţa 2. *Acţiunea bilei asupra activităţii lipazei.*

Principiul metodei. Viteza acţiunii lipazei poate fi apreciată după cantitatea acizilor graşi ce se formează la hidroliza lipidelor laptelui sub influenţa acestei enzime. Cantitatea acizilor graşi se determină prin titrare cu bază în prezenţa fenolftaleinei. Bila activizează lipaza pancreatică şi hidroliza grăsimii se accelerează. Activitatea lipazei se exprimă în ml soluţie de NaOH 0,05N consumate la titrare şi poate fi reprezentată grafic, notînd pe ordonată cantitatea de NaOH (ml) consumat, iar pe abcisă - timpul (min).

Mod de lucru. În două baloane se iau cîte 100 ml lapte şi cîte 10 ml soluţie de pancreatină de 5%. În primul balon se adaugă 10 ml bilă, iar în al doilea – 10 ml apă. Conţinutul se amestecă. Din fiecare balon se trec în eprubete cîte un ml de amestec şi se adaugă 1-2 picături de fenolftaleină de 0,5%. Conţinutul eprubetelor se titrează cu soluţie de NaOH de 0,05 N pînă la apariţia culorii roze. Baloanele cu amestecurile rămase se pun în baia de apă la 38°C.

Titrarea se va repeta de 4-5 ori cu interval de 10 minute, folosindu-se eşantioane noi de amestecuri din ambele baloane.

Notă: Fiecare grupă foloseşte aceleaşi 2 baloane cu amestecuri iniţiale.

Experienţa 3. *Identificarea acizilor biliari. Reacţia Petencofer.*

Principiul reacției. La interacțiunea acizilor biliari cu oximetilfurfurolul (derivat din zaharoză sub acțiunea acidului sulfuric concentrat) se formează un complex de culoare roșie-violetă.

Mod de lucru. Într-o eprubetă uscată se introduc 2 picături de bilă și 2 picături de zaharoză de 20%. Conținutul eprubetei se agită. Se adaugă 5-6 picături de acid sulfuric concentrat. Peste 2-3 minute conținutul eprubetei se colorează în roșu-violet.

Teme pentru autopregătire

1. Importanța lipidelor în alimentație.
2. Digestia și absorbția lipidelor în tractul gastrointestinal.
3. Acizii biliari – clasificarea, structura, funcțiile. Metabolismul acizilor biliari (noțiuni generale).
4. Resinteza lipidelor în enterocite. Soarta lipidelor resintetizate. Metabolismul LPP.
5. Catabolismul triacilglicerolilor – reacțiile parțiale, enzimele, reglarea.
6. Oxidarea glicerolului – reacțiile parțiale, enzimele, coenzimele, reglarea, randamentul energetic al oxidării anaerobe și aerobe.
7. Oxidarea acizilor grași:
   - saturați cu număr par de atomi de carbon;
   - nesaturați cu număr par de atomi de carbon;
   - saturați cu număr impar de atomi de carbon;
   - în peroxizomi.

   Reacțiile parțiale, enzimele, coenzimele, reglarea, randamentul energetic.
8. Oxidarea fosfo-, sfingo- și glicolipidelor.
9. Metabolismul corpilor cetonici. Căile biosintezei și utilizării lor – reacțiile parțiale, enzimele, coenzimele, reglarea. Rolul biologic al corpilor cetonici.

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. Comparați numărul moleculelor de ATP ce se formează la oxidarea completă (pînă la CO_2 și apă) a unei molecule de acid capronic și a unei molecule de glucoză. Ce concluzie puteți trage?

2. Primele trei reacții ale ciclului β-oxidării acizilor grași amintesc o succesiune de reacții ale ciclului Krebs. Scrieți ambele succesiuni.

3. Cîte molecule de ATP se formează la oxidarea completă (pînă la CO_2 şi apă) a unei molecule de palmitooleomargarianat (C_{16}, $C_{18}^{9,10}$, C_{17})? Explicaţi.

4. Cîte molecule de ATP se formează la oxidarea completă (pînă la CO_2 şi apă) a unei molecule de acid α-hidroxibutiric?

5. Scrieţi reacţia stoichiometrică a transformării glicerolului în acid piruvic. Ce enzime sunt necesare, cu excepţia celor glicolitice?

6. Cum se reflectă lipsa glucidelor în raţia alimentară asupra utulizării lipidelor în calitate de sursă energetică?

7. Numiţi şi scrieţi structura acizilor graşi indispensabili. Care sunt principalele surse alimentare de acizi graşi indispensabili?

8. Presupunem că o mutaţie în promotor induce sinteza proteinkinazei AMPc dependente în adipocite. Cum se va modifica metabolismul lipidelor în ele?

9. Chilomicronii se formează:

a) în duoden şi conţin lipide legate covalent de proteine;
b) în celule hepatice specializate şi conţin colesterol şi proteine;
c) în sînge din LPP circulante şi conţin cca 60% trigliceride;
d) în celulele epiteliului intestinului şi conţin cca 85% trigliceride.

10. Care din afirmaţiile de mai jos nu caracterizează lipoproteinlipaza?

a) este localizată în membrana celulelor endoteliale;
b) posedă activitate fosfolipazică;
c) este activată de fosfolipide şi apolipoproteina C-II;
d) hidrolizează restul acidului gras din poziţia II a glicerolului;
e) lipseşte sau cantitatea ei este micşorată în hiperlipidemia de tip I.

TEMA 19

Biosinteza lipidelor

Experienţa 1. ***Dozarea colesterolului în serul sanguin.***

a) *Cu anhidrida acetică.*

Principiul reacţiei. Colesterolul reacţionează cu anhidrida acetică în prezenţa acidului sulfuric concentrat (amestecul se numeşte reactivul nr. 1), rezultînd o coloraţie verde.

Mod de lucru. Într-o eprubetă uscată se introduc 0,1 ml ser sanguin. Cu un ***cilindru uscat*** se măsoară 2,1 ml reactiv nr. 1 şi repede (***foarte***

atent) se toarnă în eprubeta cu ser. Conţinutul eprubetei se agită (*atent!*) de 10-15 ori şi se lasă la temperatura camerei 20 minute până la apariţia culorii verzi. După incubare, soluţia se fotocolorimetrează în cuve ***uscate*** (5 mm) faţă de apă (filtrul roşu).

Notă: 1. Calculul se efectuează după curba etalon.
2. Experienţa se va efectua numai în prezenţa profesorului.

Valorile normale: 2,97-8,97 mM/l

b) *Cu clorura de fier.*

Principiul metodei. Metoda se bazează pe reacţia Salkowski. Colesterolul interacţionînd cu clorura de fier în mediul acid dă o coloraţie roşie-purpurie.

Mod de lucru. Experienţa se efectuează conform schemei.

Reactivi (ml)	Proba	Standard	Etalon
Ser sanguin	0,1	-	-
Standard de colesterol	-	0,1	-
Soluţie acetică de clorură fierică	4.0	4,0	-

Amestecul se agită şi se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute. Supernatantul se transferă în eprubete obişnuite :

Supernatant (ml)	3,0	3,0	-
Sol.acetică de clorură de fier	-	-	3,0
H_2SO_4 (conc.)	2,0	2,0	2,0

Formula de calcul: $C\ (mg/100ml) = \frac{E_{probei}}{E_{standard}} \times 250.$

Valorile normale: 200-260 mg/100ml.

Importanţa clinică. Majorarea conţinutului de colesterol în serul sanguin (hipercolisterolemia) se constată în ateroscleroză, diabet zaharat, nefroze, nefrite, icter obturativ etc. Scăderea conţinutului (hipocolesterolemia) are loc în anemii, tuberculoză, inaniţie, hipertiroidism, icter hepatic etc.

Experienţa 2. ***Identificarea vitaminelor liposolubile în lichidele biologice.***

a) *Vitamina A.*

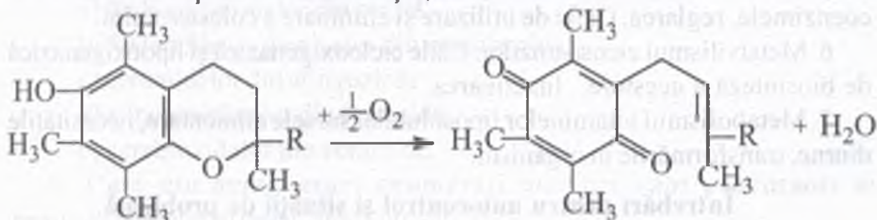
Principiul reacţiei. Vitamina A dă cu acidul tricloracetic o coloraţie galbenă care virează în albastru.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 0,5 ml soluţie uleioasă de vitamina A şi 1 ml soluţie TCA de 30%. Apare o culoare galbenă care virează în albastru.

b) *Vitamina D.*

Principiul reacţiei. Vitamina D formează cu acidul tricloracetic o culoare roşie ce virează în albastru-deschis (reacţia Rosenheim).

Mod de lucru. Într-o eprubetă se ia 1 ml soluţie de vitamina D şi 1 ml TCA de 10%. Apare o culoare roşie, ce virează în albastru.



c) *Vitamina E.*

Principiul reacţiei. Vitamina E este oxidată de acidul azotic, rezultînd un compus cu structură parachinonică de culoare roşie (vezi schema reacţiei de mai sus).

Mod de lucru. Într-o eprubetă se ia 1 ml soluţie uleioasă de vitamina E şi 7-8 picături de HNO_3. Amestecul se încălzeşte cu atenţie pe baia de apă 1-2 minute. Apare o culoare roşie.

Importanţa clinico-diagnostică. Practic nu se întîlnesc hipervitaminoze A, D sau E. Hipovitaminoza A se manifestă la nivelul ochilor prin nictalopie şi heteralopie; xeroftalmie şi keratomalacie; la nivelul pielii prin hiperkeratoză şi frenodermie; la nivelul aparatului genital şi de reproducere prin atrofia organelor şi sterilitate. Hipovitaminoza D provoacă la copii rahitismul şi la maturi osteomalacie. Hipovitaminoza E determină amplificarea patologică a proceselor de oxidare a lipidelor.

Teme pentru autopregătire

1. Biosinteza acizilor graşi:
   - saturaţi cu număr par de atomi de carbon;
   - nesaturaţi cu număr par de atomi de carbon;
   - saturaţi cu număr impar de atomi de carbon.

   Enzimele, coenzimele, reglarea.

2. Biosinteza acilgliceridelor: substanţele iniţiale, enzimele şi coenzimele, reglarea.

3. Biosinteza fosfogliceridelor: substratele, reacţiile parţiale ale căilor I şi II; enzimele şi coenzimele, reglarea. Substanţele lipotrope, rolul lor.

4. Biosinteza sfingo- şi glicolipidelor: precursorii, reacţiile principale, enzimele, reglarea.

5. Metabolismul colesterolului. Biosinteza colesterolului – substratele, etapele, reacţiile parţiale ale primei etape (pînă la acidul mevalonic), enzimele, coenzimele, reglarea. Căile de utilizare şi eliminare a colesterolului.

6. Metabolismul eicosanoizilor. Căile ciclooxigenazică şi lipooxigenazică de biosinteză a acestora. Inactivarea.

7. Metabolismul vitaminelor liposolubile: sursele alimentare, necesităţile diurne, transformările în organism.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Comparaţi următoarele trăsături ale oxidării şi biosintezei acizilor graşi:
   a) localizarea procesului;
   b) transportul resturilor "acil" prin membrana mitocondrială;
   c) agenţii oxidanţi şi reducători;
   d) organizarea complexelor polienzimatice.

2. Indicaţi principalele două procese ce furnizează $NADPH{\cdot}H^+$ necesar pentru biosinteza acizilor graşi. Scrieţi reacţiile în care nemijlocit se formează $NADPH{\cdot}H^+$.

3. Scrieţi succesiunea reacţiilor formării acidului arahidonic în organism. Care este rolul biologic al acestui acid?

4. De ce etanolul se poate transforma în lipide, iar în glucide – nu? Sinteza căror lipide este stimulată în cazul consumului abuziv de etanol? Scrieţi schematic reacţiile transformării etanolului în acizi graşi.

5. Care sunt deosebirile metabolismului colesterolului la vegetarieni şi la persoanele ce consumă şi produse de origine animală? Care sunt cauzele acestor deosebiri?

6. Colesterolul este precursorul următoarelor substanţe:
   a) acidului chenodezoxicolic;
   b) 1,25-dixidroxicolecalciferolului;
   c) testosteronului;
   d) acidului glicocolic;

e) colecistokininei.

7. 1,25-dixidroxicolecalciferolul se formează:

a) în piele din 7-dihidrocolesterol sub acţiunea razelor UV;

b) în ficat din colecalciferol;

c) în rinichi din 25-hidroxicolecalciferol;

d) în intestin din vit.D;

e) nu se sintetizează în organismele mamiferelor.

8. Numiţi substanţa activată în cazul biosintezei:

a) fosfatidilserinelor din serină;

b) fosfatidiletanolaminelor din etanolamină;

c) ceramidelor din sfingozină;

d) sfingomielinelor din ceramide;

e) cerebrozidelor din ceramide.

9. Care din acizii graşi enumeraţi mai jos sunt precursori ai prostaglandinelor în organismul uman:

a) acidul linoleic;

b) acidul linolenic;

c) acidul Δ5,8,11-eicozotrienoic;

d) acidul Δ8,11,14-eicozotrienoic.

TEMA 20

Reglarea şi patologia metabolismului lipidic

Experienţa 1. ***Determinarea conţinutului total de fosfolipide în serul sanguin.***

Principiul metodei. Fosfolipidele serului se precipită cu acidul tricloracetic. În precipitatul obţinut se determină fotocolorimetric conţinutul fosforului. Înmulţind cantitatea fosfatului lipidic cu 25 se calculează cantitatea totală de fosfolipide.

Mod de lucru. Într-o eprubetă conică *(proba experimentală)* se introduc 3 ml apă distilată şi 0,2 ml ser sanguin. Se adaugă ***foarte atent cu picătura*** 3 ml soluţie de acid tricloracetic de 10 %, agitînd permanent eprubeta. Peste 2 minute soluţia se centrifughează 2 minute la 3000 turaţii/min. Supernatantul se varsă, eprubeta se intoarce cu fundul în sus pe o hîrtie de filtru pînă se va scurge tot lichidul. Marginea eprubetei se usucă cu hîrtie de filtru.

La sediment se adaugă 1 ml soluție $HClO_4$ de 42% și cîteva mărgele de sticlă pentru fierberea uniformă. Eprubeta se pune pe baia de apă în clocot pe 20 -30 minute, apoi se răcește și se adaugă 5 ml apă.

Proba standard. Într-o eprubetă obișnuită se introduc 0,8 ml soluție de $HClO_4$ de 42% și 2 ml soluție standard de fosfat. Volumul eprubetei se completează cu apă pînă la 5 ml.

Proba martor. Într-o eprubetă obișnuită se introduc 0,8 ml soluție de $HClO_4$ de 42% și 5,2 ml de apă.

În fiecare eprubetă (de experiență, standard și martor) se introduc cîte 1 ml soluție de acid ascorbic de 1%. Volumul fiecărei soluții se completează pînă la 10 ml cu apă distilată. Conținutul eprubetelor se agită.

Peste 5 minute probele de experiență și standard se fotocolorimetrează față de martor (filtrul de lumină roșie, cuvele de 10 mm).

Notă: În fiecare grupă se vor efectua cîte 2 probe martor.

Calculul se efectuează după formula:

$$\text{Fosfatul lipidic} = \frac{E_{exp} \cdot 0{,}02 \cdot 100}{E_{st} \cdot 0{,}2} = \frac{E_{exp} \cdot 10}{E_{st.}},$$

unde: 0,02 – cantitatea fosforului conținut în 2 ml de soluție standard.
0,2 – cantitatea serului în proba de experiență.

Pentru a reprezenta conținutul fosfatului lipidic în unități SI (mM/l) rezultatul se înmulțește cu coeficientul 0,32.

Valorile normale: 1,97 – 4,68 mM/l (6,1–15,5 mg %).

Conținutul fosfolipidelor sanguine poate fi determinat înmulțind cantitatea fosfatului lipidic cu 25. Cantitatea lor normală constituie 1,35-3,62 g/l (152 –362 mg%).

Importanța clinică. Majorarea conținutului de fosfolipide în serul sanguin se constată în diabetul zaharat, nefroze, nefrite cronice, colestază etc. În ateroscleroză, anemii, distrofii alimentare cantitatea lor scade.

Experiența 2. ***Identificarea corpilor cetonici.***

Principiul metodei. Acetona și acidul acetolacetic, interacționînd în mediul bazic cu nitroprusiatul de sodiu, colorează soluția în roșu-portocaliu.

Mod de lucru. Într-o eprubetă *uscată* se introduc cîte 2 picături de urină, soluție de NaOH de 10% și soluție de nitroprusiat de sodiu de 10%. Conținutul eprubetei se colorează în roșu-portocaliu.

Experienţa 3. ***Determinarea conţinutului de β-lipoproteide în serul sanguin.***

Principiul metodei. β-lipoproteidele, interacţionînd cu heparina, formează un complex ce se precipită sub influenţa clorurii de calciu. Cantitatea (intensitatea) precipitatului format este direct proporţională cu conţinutul lipoproteidelor.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se introduc 2 ml soluţie de clorură de calciu de 0,27% şi 0,2 ml ser sanguin. Conţinutul eprubetei se agită şi se măsoară densitatea optică a soluţiei experimentale (E_1) faţă de soluţia de $CaCl_2$ (cuva – 5 mm, filtrul de lumină roşie). Soluţia din cuvă se toarnă din nou în eprubetă şi se adaugă 0,04 ml soluţie de heparină de 1%. Conţinutul eprubetei se agită şi *exact* peste 4 minute se determină densitatea optică a soluţiei în condiţiile descrise anterior (E_2).

Formula de calcul: $X (g/l) = (E_2 - E_1) \cdot 100$, unde 100 – coeficient standard empiric.

Valorile normale: 3,0 - 4,4 g/l (300-450 mg%).

Importanţa clinică. Majorarea conţinutului de β-lipoproteide în serul sanguin se constată în ateroscleroză, icter mecanic, afecţiuni hepatice, diabet zaharat, obezitate etc. Scăderea conţinutului se întîlneşte foarte rar (de exemplu, în plasmocitom).

Teme pentru autopregătire

1. Reglarea metabolismului lipidelor la nivelul celulei.

2. Reglarea neurohormonală a metabolismului lipidelor. Rolul lipotropinelor, ACTH, hormonilor tiroizi, insulinei, glucagonului, glucocorticoizilor şi catecolaminelor.

3. Relaţiile reciproce dintre metabolismul energetic, glucidic şi lipidic.

4. Dereglările digestiei şi absorbţiei lipidelor. Steatoreea pancreatică, hepatică şi intestinală.

5. Dislipidemiile:

a) hipolipoproteinemiile familiale – afecţiunea Tangier, α- şi β-lipoproteinemia familială;

b) hiperlipoproteinemiile primare şi familiale;

c) hiperlipoproteinemiile secundare (dobîndite) – în diabet zaharat, alcoolism, afecţiuni ale glandelor endocrine.

Cauze, mecanismele dereglării metabolismului lipidelor, manifestările biochimice.

6. Lipidozele tisulare:

a) ereditare – Neimann-Pick, Tay-Sachs, Krabbe, Gaucher, Farber, leucodistrofia metacromatică, gangliozidoza GM_1;

b) dobîndite – obezitate, ateroscleroză, alcoolism.

Cauze, mecanismele dereglării metabolismului lipidelor, manifestările biochimice.

7. A-, hipo- şi hipervitaminozele A, D, E, K – cauze, manifestări metabolice.

8. Rolul eicosanoizilor în procesele inflamatorii, reacţiile alergice, dereglările fluidităţii sanguine.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. În afecţiunile pancreasului însoţite de insuficienţă funcţională:

a) scade digestia lipidelor din cauza micşorării pH-ului conţinutului duodenal;

b) scade absorbţia lipidelor din cauza creşterii pH-ului conţinutului duodenal;

c) scade digestia şi absorbţia lipidelor din cauza micşorării secreţiei enzimelor lipolitice;

d) scade absorbţia vitaminelor grupei B;

e) se dezvoltă steatoree pancreatică.

2. Toate afirmaţiile de mai jos referitoare la hiperlipidemia de tipul II A (hipercolesterolemia familială) sunt corecte cu excepţia:

a) nivelul LDL este crescut;

b) este condiţionată de carenţa LDL-receptorilor în ţesuturile extrahepatice;

c) este dereglată biosinteza extrahepatică a colesterolului;

d) constituie un risc sporit de afectare a arterelor coronariene;

e) este o afecţiune rară, transmisă autosomal-recesiv.

3. Indicaţi enzima carenţială şi compusul ce se acumulează în fiecare afecţiune:

a) Neimann-Pick,(ex.)	galactozidaza	gangliozidul GM_2
b) Tay-Sachs,	galactocerebrozidaza	sfingomieline
c) Krabbe,	glucozidaza	sulfatide
d) Gaucher,	sfingomielinaza	gangliozidul GM_2
e) Leucodistrofia metacromatică,	sulfatidaza	glucocerebrozide
f) Gangliozidoza GM_1	hexozaminidaza A	galactocerebrozide

4. Indicaţi succesiunea dereglărilor metabolismului lipidelor în organismul alcoolicilor ce determină apariţia steatozei hepatice.

5. Ce clasă de lipoproteide plasmatice constituie factorul de risc “pozitiv” în ateroscleroză? Numiţi enzima cu rolul central în metabolismul acestor lipoproteide plasmatice. Scrieţi reacţia catalizată de ea.

6. Cum pot fi deosebite după hemoragiile cutanate hipovitaminozele K şi C? Care sunt mecanismele apariţiei lor într-un caz şi în altul?

CAPITOLUL VI

Metabolismul proteinelor şi nucleotidelor

Pentru a se putea include în metabolismul general, proteinele alimentare trebuie să fie supuse proceselor de digestie şi de absorbţie.

Digestia proteinelor alimentare are loc la diferite nivele ale tractului gastrointestinal sub acţiunea enzimelor proteolitice: pepsinei, tripsinei, chimotripsinei, carboxipeptidazelor, aminopeptidazelor şi dipeptidazelor. În urma acţiunii exercitate de către exo- şi endopeptidaze, macromoleculele proteinelor alimentare sunt scindate pînă la aminoacizi.

Absorbţia proteinelor are loc sub forma aminoacizilor corespunzători sau eventual sub formă de dipeptide sau peptide cu masa moleculară mică. Pe cale portală, aminoacizii ajung la ficat de unde pe cale sanguină sunt repartizaţi în diferite organe şi ţesuturi. Transportul aminoacizilor prin membrane este un proces activ.

Metabolismul intermediar al aminoacizilor se realizează prin mecanisme generale de degradare şi biosinteză, comune tuturor aminoacizilor, dar şi pe căi particulare, proprii fiecărui aminoacid în parte. Principalele mecanisme generale de degradare a aminoacizilor sunt dezaminarea, transaminarea şi decarboxilarea.

Dezaminarea conduce la eliberarea amoniacului. În organismele animale se întîlneşte practic numai dezaminarea oxidativă, care conduce la formarea unui cetoacid. În ţesuturi se desfăşoară cu mare intensitate dezaminarea oxidativă a acidului glutamic sub acţiunea catalitică a glutamatdehidrogenazei, enzimă care are drept cofactor NAD. Acidul glutamic poate regenera prin dezaminare oxidativă acidul α-cetoglutaric, care devine apt să accepte grupările amino de la majoritatea aminoacizilor. Din această cauză acidul glutamic este colectorul universal al grupărilor amino.

Acidul piruvic sau acidul oxalilacetic, pecum şi alţi α-cetoacizi, pot funcţiona drept acceptori de grupări amino atunci cînd se transformă în alanină şi respectiv în acid aspartic. Acest proces poartă denumirea de transaminare. Reacţiile de transaminare sunt catalizate de enzime specifice cum sunt aspartataminotransferaza (AST) şi alaninaminotransferaza (ALT). Ele au drept coenzimă piridoxalfosfatul.

Decarboxilarea are loc sub acţiunea aminoaciddecarboxilazelor, a căror coenzimă este tot piridoxalfosfatul. Decarboxilarea este mai puţin o cale de degradare a aminoacizilor şi mai mult o cale de biosinteză a unor amine cu acţiune biologică marcată, denumite şi amine biogene, aşa ca histamina, triptamina, serotonina, tiramina etc.

Deci, din dezaminarea directă sau din transaminarea cuplată rezultă amoniac şi un cetoacid. Cetoacizii rezultaţi pot lua căi variate de transformare: a) pot fi antrenaţi în procese de aminare, ajungîndu-se la biosinteza de aminoacizi; b) se pot transforma în intermediarii ciclului Krebs şi, deci, pot fi oxidaţi pînă la CO_2 şi H_2O.

Amoniacul, provenit din metabolismul aminoacizilor, este convertit într-un compus puţin toxic, glutamina care reprezintă forma sa de transport.

Din amoniacul provenit din aminoacizi şi glutamină, şi din dioxid de carbon în ficat, printr-un proces care decurge în mai multe etape, se sintetizează ureea (ciclul Krebs - Henseleit).

Numeroşi aminoacizi prezintă şi căi particulare de metabolizare cînd se formează intermediari, dotaţi ei înşişi cu remarcabilă activitate biologică.

În cadrul metabolismului intermediar, sub acţiunea nucleazelor, acizii nucleici sunt degradaţi pînă la mononucleotide. În continuare nucleotidele purinice sunt hidrolizate pînă la eliberarea acidului fosforic, a pentozei, adeninei sau guaninei. La om produsul final de catabolism al bazelor purinice este acidul uric. Perturbări ale catabolismului purinic, însoţit de creşterea concentraţiei acidului uric sanguin, se întîlnesc în boala numită gută.

Bazele pirimidinice sunt catabolizate prin mecanisme specifice, formîndu-se NH_3, CO_2 şi β-aminoacizi, care la rîndul lor se supun degradării.

Biosinteza nucleotidelor purinice are loc pornindu-se de la precursori simpli: glutamina, acidul aspartic, glicocolul, dioxidul de carbon, grupările formil, ribozo-5-fosfat. Precursorii biosintezei nucleotidelor pirimidinice sunt carbamoilfosfatul, acidul aspartic şi 5-fosforibozil-1-pirofosfatul.

TEMA 21

Metabolismul proteinelor simple. Digestia şi absorbţia proteinelor. Putrefacţia proteinelor în intestin

Experienţa 1. ***Determinarea acidităţii sucului gastric.***

Principiul metodei. Aciditatea totală a sucului gastric este constituită din HCl liber, HCl fixat, fosfaţi acizi şi acizi organici (ultimele două componente pot fi asociate sub termenul de alte substanţe acidoreagente). HCl total este suma HCl liber şi HCl fixat. Alte substanţe acidoreagente constituie diferenţa dintre aciditatea totală şi HCl total.

Aciditatea sucului gastric se determină prin metoda titrării cu bază şi se măsoară în cantitatea de ml soluţie de NaOH de 0,1 N consumată la neutralizarea a 1000 ml de suc gastric în prezenţa indicatorilor: la determinarea acidităţii totale – fenolftaleinei, HCl liber – dimetilaminoazobenzenului, HCl fixat – hidrogensulfonatalizarinei de sodiu.

În normă la adult aciditatea totală constituie 40-60 unităţi de titrare; HCl liber – 20-40 ; HCl fixat – 10-12; celelalte substanţe acidoreagente - 2-5.

Mod de lucru:

1. *Determinarea HCl liber.*

Într-un balon de titrare se iau 5 ml suc gastric, se adaugă o picătură soluţie de dimetilaminoazobenzen de 0,5% şi se titrează din biuretă cu soluţie de NaOH de 0,1 N pînă la apariţia culorii oranj. Se face calculul.

2. *Determinarea acidităţii totale.*

Într-un balon de titrare se iau 5 ml de suc gastric, se adaugă o picătură soluţie de fenolftaleină de 0,5% şi se titrează din biuretă cu soluţie de NaOH de 0,1 N pînă la apariţia culorii roz. Se face calculul.

3. *Determinarea tuturor tipurilor de aciditate într-o singură porţie de suc gastric (Metoda Mihaelis).*

Într-un balon de titrare se iau 5 ml de suc gastric, se adaugă o picătură soluţie de fenolftaleină de 0,5% şi o picătură soluţie de dimetilaminoazobenzen de 0,5%. Se notează nivelul bazei în biuretă şi se titrează, agitînd permanent. Se notează nivelul bazei la trecerea culorii roşii iniţiale în portocalie (punctul A care corespunde HCl liber), nivelul bazei la apariţia culorii galben-deschisă (punctul B, care serveşte la determinarea HCl total) şi nivelul bazei la apariţia culorii roz (punctul C, care corespunde acidităţii totale). În punctele

B şi C nivelurile bazei sunt citite de la nivelul iniţial. Se face calculul tuturor tipurilor de aciditate ţinînd cont de faptul că media aritmetică a punctelor B şi C corespunde HCl total.

Importanţa diagnostică. În afecţiunile stomacului, aciditatea poate fi nulă (suc anacid), ridicată (suc hiperacid), scăzută (suc hipoacid). Sucul hiperacid se constată în boala ulceroasă a stomacului şi gastrita hiperacidă; sucul hipoacid – în gastrita hipoacidă sau cancerul stomacal; sucul anacid (absenţa deplină a HCl şi scăderea considerabilă a acidităţii totale) – în cancerul stomacal, gastrită cronică, anemia pernicioasă.

Experienţa 2. *Problemă de analiză a sucului gastric.*

Fiecare student primeşte o probă de suc gastric şi determină în ea toate tipurile de aciditate (vezi experienţa 1); trage o concluzie cu privire la devierea acidităţii şi indică patologia în care se întîlneşte această deviere.

Experienţa 3. *Componentele patologice ale sucului gastric şi identificarea lor.*

Într-o serie de afecţiuni, în sucul gastric pot apărea componente patologice aşa ca sîngele (din cauza ulceraţiei pereţilor stomacului), pigmenţii biliari (ca urmare a antiperistaltismului), acidul lactic şi alţi acizi organici – acetic, butiric (în aclorhidrie în stomac decurg procesele de fermentaţie).

1. *Identificarea acidului lactic (reacţia Uffelmann).*

Principiul reacţiei. Acidul lactic, în prezenţa fenolatului de fier (reactivul Uffelmann), formează lactatul de fier de culoare verde-gălbuie.

Mod de lucru. 5 picături de suc gastric se adaugă la reactivul Uffelmann (20 picături soluţie fenol de 1% + 2 picături soluţie de triclorură de fier de 1%). În prezenţa acidului lactic culoarea violetă a lichidului trece în verde-gălbuie.

Reactivul Uffelmann (fenolatul de fier – $(C_6H_5O)_3Fe$).

Preparare. La 20 picături de soluţie de fenol de 1% se adaugă 2 picături de soluţie de clorură de fier de 1%. Amestecul se colorează în violet.

2. *Identificarea sîngelui (reacţia benzidinică).*

Principiul reacţiei. Proba benzidinică se bazează pe oxidarea benzidinei de către oxigenul atomar, format la descompunerea peroxidului de hidrogen de către hemoglobină, care exercită acţiune peroxidazică.

Mod de lucru. La 5 picături soluţie de benzidină de 1% se adaugă 5

picături soluţie de H_2O_2 de 3% şi 5 picături de suc gastric. Apariţia unei coloraţii albastre indică prezenţa sîngelui şi reacţia este considerată pozitivă.

Teme pentru autopregătire

1. Valoarea biologică a proteinelor. Bilanţul azotat. Necesarul de proteină în alimentaţie. Starea dinamică a proteinelor.

2. Digestia proteinelor în stomac şi intestin. Secreţia HCl şi reglarea ei (H^+, K^+-ATP-aza).

3. Endo- şi exopeptidazele, specificitatea de acţiune a proteinazelor.

4. Proenzimele proteinazelor şi mecanismul convertirii lor în enzime active.

5. Reglarea secreţiei sucului gastric, pancreatic şi intestinal.

6. Absorbţia aminoacizilor în intestin. Fondul metabolic comun al aminoacizilor.

7. Putrefacţia aminoacizilor în intestin.

8. Alimentaţia proteică parenterală.

9. Compoziţia sucului gastric şi modificările lui în patologie.

10. Principiul determinării tuturor tipurilor de aciditate a sucului gastric şi identificării componentelor patologice ale sucului gastric.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. În ce constă specificitatea de acţiune a următoarelor proteaze: a) tripsinei; b) chimotripsinei; c) pepsinei; d) carboxipeptidazei; e) aminopeptidazei.

2. Care dintre proteinele alimentare enumerate mai jos au valoare biologică redusă: a) cazeina; b) ovalbumina; c) zeina; d) glutelina; e) gliadina?

3. Care dintre aminoacizii enumeraţi sunt aminoacizi neesenţiali: a) fenilalanina; b) triptofanul; c) lizina; d) acidul glutamic; e) alanina?

4. Care dintre enzimele proteolitice enumerate se conţin în sucul pancreatic: a) chimotripsina; b) renina; c) aminopeptidaza; d) carboxipeptidaza; e) elastaza?

5. Tripsina participă la activarea: a) tripsinogenului; b) pepsinogenului; c) chimotripsinogenului; d) procarboxipeptidazelor; e) enterokinazei?

6. Selectaţi afirmaţiile juste. Putrefacţia proteinelor: a) decurge în ficat; b) duce la formarea produşilor toxici; c) ficatul conţine enzima UDP-glucuroniltranferaza; d) ficatul nu conţine enzima arilsulfotransferaza; e) acizii conjugaţi netoxici se excretă cu masele fecale.

7. Suferindul a fost internat în legătură cu dureri în regiunea abdomenului. Investigaţiile biochimice au arătat conţinut mărit de indican în sînge şi urină. Scrieţi reacţiile de sinteză a indicanului. Ce indică creşterea conţinutului de indican? De ce acest indice poate determina tactica chirurgului?

8. Proteina a fost expediată la laborator ca obiect de studiu al valorii ei biologice în alimentaţie. Prin ce metode de investigaţie poate fi rezolvată această problemă?

TEMA 22

Metabolismul intermediar al aminoacizilor în ţesuturi. Produsele finale ale metabolismului azotat.

Experienţa 1. *Determinarea activităţii aminotransferazelor.*

Aminotransferazele catalizează reacţiile de transformare – transferul reversibil al grupării amino de la aminoacid la cetoacid. Cea mai mare importanţă prezintă determinarea activităţii aspartataminotransferazei (AST) şi alaninaminotransferazei (ALT). Aceste enzime posedă activitate catalitică mare şi sunt larg răspîndite în diverse organe şi ţesuturi.

AST catalizează reacţia:

Acidul aspartic + acidul α-cetoglutaric $\rightarrow$ acidul glutamic + acidul oxalilacetic.

ALT catalizează reacţia:

Alanina + acidul α-cetoglutaric $\rightarrow$ acidul glutamic + acidul piruvic.

Principiul metodei. Sub acţiunea ALT şi AST se formează corespunzător acidul oxalilacetic şi acidul piruvic. Acidul oxalilacetic este capabil să se transforme în acid piruvic. La adăugarea 2,4-dinitrofenilhidrazinei acide, procesul enzimatic este anihilat şi se formează dinitrofenilhidrazona acidului piruvic, care în mediu alcalin dă o coloraţie roşie-brună, intensitatea căreia este direct proporţională cu cantitatea de acid piruvic rezultat.

Activitatea aminotransferazelor se exprimă prin mM de acid piruvic format de 1 litru ser sanguin la incubarea în termostat timp de o oră la temperatura de 37°C. În serul sanguin în normă activitatea AST constituie 0,1 - 0,45 mM piruvat/l ser/oră, iar activitatea AlT – 0,1 - 0,68.

Mod de lucru. În două eprubete (proba experimentală şi proba de control) se introduc cîte 0,5 ml soluţie amestec de substraturi (alanina şi

α-cetoglutarat). Eprubetele se introduc pentru 5 minute în baia de apă la temperatura de 37°C. Apoi în eprubeta experimentală se adaugă 0,1 ml ser sanguin, iar în cea de control – 0,1 ml apă şi 0,5 ml soluţie de 2,4-dinitrofenilhidrazină. Ambele eprubete se introduc pentru 30 minute în baia de apă la temperatura de 37°C.

După 30 minute, eprubetele se scot din baia de apă şi în cea experimentală se adaugă 0,5 ml soluţie 2,4-dinitrofenilhidrazină. Ambele eprubete se lasă la temperatura camerei pentru 20 minute. Apoi în ele se introduc cîte 5 ml soluţie de NaOH de 0,4 N, conţinutul se agită cu grijă; se lasă pentru 10 minute la temperatura camerei după ce se colorimetrează la fotoelectrocolorimetru, folosindu-se cuva de 10 mm grosime şi filtrul de lumină verde (500-560 nm). Fotocolorimetrarea se efectuează contra probei de control. Calculul se face după curba etalon.

Valoarea diagnostică

1. Determinarea activităţii aminotransferazelor are o mare importanţă în diagnosticul afecţiunilor cordului. În 95% cazuri de infarct miocardic, activitatea AST creşte. Creşterea activităţii apare peste 4-6 ore, manifestîndu-se clar peste 24-36 ore. După 3-7 zile activitatea atinge valori normale.

2. Determinarea activităţii aminotransferazelor prezintă un mare interes clinic în diagnosticul diferenţial al bolilor de ficat. Activitatea ambelor transaminaze, îndeosebi a ALT, creşte în hepatita infecţioasă. Creşterea activităţii ALT în perioada de incubare şi în formele anicterice ale hepatitei infecţioase prezintă importanţă pentru diagnostic. În hepatopatie toxică şi acutizarea hepatitei cronice se observă cifre crescute ale activităţii ALT. Ciroza ficatului nu este însoţită de hiperenzimie pronunţată. La bolnavul cu icter mecanic, activitatea aminotransferazelor este normală sau puţin mărită.

Experienţa 2. ***Determinarea ureei în urină.***

Ureea este amida completă a acidului carbonic sintetizată în ficat. Zilnic cu urina se excretă 20-35 g sau 333-585 mM de uree.

Principiul metodei. Metoda se bazează pe facultatea ureei de a forma cu p-dimetilbenzaldehida în mediu acid o combinaţie complexă de culoare galbenă. Intensitatea culorii este direct proporţională cu concentraţia ureei în urină.

Mod de lucru. Se pune cu pipeta într-o eprubetă 0,2 ml urină şi 1,2 ml soluţie p-dimetilaminobenzaldehidă de 2%. Conţinutul se agită, iar după 15 minute proba se fotocolorimetrează în cuva de 3 mm grosime şi filtrul de lumină albastră contra apei distilate. Cantitatea de uree din urină este calculată după curba etalon.

Valoarea diagnostică. Cantitatea ureei în urină creşte în anemia pernicioasă, febră, degradarea intensă a proteinelor în organism. Conţinutul ureei în urină scade în nefrită, acidoză, icter parenchimatos, ciroza ficatului, uremie.

Teme pentru autopregătire

1. Soarta aminoacizilor absorbiţi. Transportul aminoacizilor în celule.

2. Metabolizarea NH_2-grupelor:

a) Dezaminarea aminoacizilor. Tipurile. Glutamatdehidrogenaza.

b) Transaminarea aminoacizilor. Aminotransferazele şi importanţa clinică a determinării activităţii transaminazelor.

c) Dezaminarea indirectă a aminoacizilor.

3. Decarboxilarea aminoacizilor. Influenţa aminelor biogene asupra funcţiilor fiziologice ale organismului. Detoxifierea aminelor biogene.

4. Metabolizarea α-cetoacizilor rezultaţi din aminoacizi.

5. Detoxicarea amoniacului: sinteza glutaminei, carbamoilfosfatului, aminarea reductivă a α-cetoglutaratului.

6. Biosinteza ureei. Importanţa clinică a determinării ureei în sînge şi în urină.

7. Biosinteza aminoacizilor neesenţiali în organismul animal.

8. Principiul determinării activităţii transaminazelor serului sanguin şi ureei în urină.

Întrebări pentru autocontrol

1. Scheletele de carbon ale căror aminoacizi intră în ciclul Krebs prin intermediul: a) acetil-CoA; b) α-cetoglutaratului; c) succinatului; d) fumaratului; e) oxalilacetatului.

2. Ce α-cetoacizi se formează la transaminarea următorilor aminoacizi: a) alanina; b) glutamat; c) aspartat; d) leucina; e) fenilalanina; f) tirozina?

3. Căile metabolismului amoniacului: a) sinteza glutaminei; b) sinteza aminoacizilor; c) sinteza carbamoilfosfatului; d) sinteza ureei; e) excreţia lui cu urina.

4. Scrieţi ecuaţiile reacţiilor de sinteză a alaninei, aspartatului şi glutamatului.

5. Scrieţi ecuaţiile reacţiilor de sinteză a glutaminei şi asparaginei.

6. Din ce se sintetizează prolina, tirozina, cisteina, glicina, serina?

7. Soarta acidului glutamic: a) se decarboxilează; b) se supune transaminării; c) se oxidează; d) se carboxilează; e) se transformă în glutamină.

8. Acidul aspartic: a) se supune transaminării; b) formează asparagina; c) participă la sinteza nucleotidelor pirimidinice; d) este implicat în sinteza ureei; e) se supune dezaminării oxidative directe.

9. Transaminaza hepatică catalizează următoarele reacţii: a) dezaminarea oxidativă a glutamatului; b) transferul grupării fosfat de la piridoxalfosfat la piridoxamină; c) transferul grupării amino de la glutamat la piridoxalfosfat; d) transferul grupării amino de la piridoxamină la piruvat.

10. În ciclul sintezei ureei, enzima ornitintranscarbamoilaza participă la: a) sinteza ornitinei din citrulină; b) sinteza ureei din arginină; c) sinteza citrulinei din ornitină; d) transaminarea ornitinei; e) hidroliza ornitinei.

11. Hipertransaminazemia se observă în: a) infarctul plămînului; b) infarctul miocardic; c) hepatite; d) colecistite; e) traume vaste ale muşchilor.

12. Aminele biogene: a) se formează în urma acţiunii aminotransferazelor asupra aminoacizilor; b) acumularea lor în organism nu provoacă tulburări ale funcţiilor organismului; c) histamina posedă un spectru îngust de acţiune; d) serotonina are acţiune vasoconstrictoare; e) administrarea acidului γ - aminobutiric duce la excitaţia scoarţei cerebrale.

TEMA 23

Particularităţile metabolismului unor aminoacizi

Experienţa 1. ***Determinarea ureei din serul sanguin prin metoda colorimetrică.***

Principiul metodei. Ureea reacţionează cu diacetilmonooxima în prezenţa tiosemicarbazidei şi sărurilor de fier într-un mediu acid la încălzire cu formarea unui complex de culoare roşie. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu conţinutul de uree din serul sangiun şi se măsoară colorimetric.

Mod de lucru. Pentru precipitarea proteinelor, într-o eprubetă de

centrifigat se introduc 0,8 ml apă, 0,2 ml ser şi 1 ml soluţie de acid tricloracetic de 10%. Conţinutul se agită. Concomitent într-o eprubetă obişnuită se prepară proba martor, care conţine în loc de ser soluţie standardă de uree. După 15 minute proba de cercetat este centrifugată la 1500 rotaţii/minut timp de 10 minute. Apoi într-o eprubetă se iau 0,5 ml supernatant, iar în alta – 0,5 ml soluţie de uree, iar în a treia (proba de control) – 0,5 ml apă distilată. În toate trei eprubete se adaugă cîte 5 ml agent colorant şi se agită. Probele se încălzesc într-o baie de apă în clocot timp de 20 minute, iar apoi sunt răcite în curent de apă timp de 2-3 minute.

Probele de analizat şi proba martor sunt citite la fotocolorimetru contra probei de control, folosindu-se cuva de 10 mm şi filtrul de lumină verde.

C a l c u l u l se efectuează după formula:

$$X = \frac{E_{cer} \cdot 100}{E_{st}},$$

unde: X – concentraţia ureei în mg/100 ml;

E_{cer} – extincţia probei de cercetat;

E_{st} – extincţia probei standard (probei martor);

100 – concentraţia ureei în soluţia standard de uree (100 mg/100ml).

Cantitatea ureei creşte în nefrită, tuberculoza renală, starea febrilă, septicemie.

Experienţa 2. ***Determinarea creatininei în urină (metoda Folin).***

Creatinina, anhidrida creatinei, este o componentă normală a urinei. În urina din 24 de ore se găsesc 8,8-17,7 mM de creatinină (1,0-2,0g) la bărbaţi şi 7,1-15,9 mM (0,8-1,8 g) – la femei. Creatina se conţine în muşchi, unde formează creatinfosfat, care la degradare se transformă în fosfat şi creatinină. În urina normală a pacienţilor adulţi, creatina este absentă. Însă urina copiilor şi adolescenţilor întotdeauna conţine creatină.

Principiul metodei se bazează pe reacţia Jaffe. Creatinina în mediu alcalin reacţionează cu acidul picric cu formare de compuşi coloraţi; intensitatea culorii roşie-portocalie este direct proporţională cu concentraţia creatininei din urină şi se măsoară colorimetric.

Mod de lucru. Într-un cilindru cotat de 10 ml se pun cu pipeta 0,1 ml urină, 0,1 ml hidroxid de sodiu de 10% şi 0,15 ml soluţie saturată de acid

picric. Proba de control se realizează ca şi proba de analizat cu excepţia că în locul urinei se iau 0,1 ml apă distilată.

Probele se agită şi se lasă pentru 5 minute. Nivelul lichidului din cilindru se aduce pînă la semn (10 ml) cu apă distilată. Fotocolorimetrarea probei de cercetat se face contra probei de control, folosindu-se cuva de 3 mm grosime şi filtrul de lumină verde.

Calculul se efectuează după curba etalon, determinînd cantitatea de creatinină în 0,1 ml urină. Apoi se calculează cantitatea de creatinină în urina de 24 ore.

Valoarea diagnostică. Hipercreatininuria se întîlneşte în consum excesiv de alimente bogate în proteine, după efort muscular susţinut, în atrofia musculară, în starea febrilă, în sindromul de compresiune.

Hipocreatininuria se întîlneşte în nefrita cronică asociată cu uremie, boala polichistică a rinichiului, leucoză.

Experienţa 3. ***Dozarea acidului uric în urină.***

Acidul uric este produsul final al metabolismului bazelor purinice. În urina de 24 ore se conţin între 1,6 şi 3,54 mM (270-600 mg).

Principiul metodei. Acidul uric reduce reactivul fosfowolframic la albastru de fosfowolframat. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu cantitatea de acid uric. Cantitatea de albastru de fosfowolframat se determină prin titrare cu fericianura de potasiu, care oxidează albastru de fosfowolframat şi coloraţia albastră dispare.

Mod de lucru. La 1,5 ml urină se adaugă 1 ml soluţie carbonat de sodiu de 20% şi 1 ml reactiv fosfowolframic. Conţinutul probei se agită şi se titrează cu soluţie de fericianură de potasiu de 0,01 N pînă la dispariţia coloraţiei albastre.

Calculul se efectuează după formula:

$$X = \frac{0{,}8ab}{1{,}5} \text{ mg/24 ore,}$$

unde: 0,8 – cantitatea, în mg, de acid uric, care corespunde unui ml de fericianură de potasiu;

a – cantitatea de fericianură de potasiu care s-a consumat la titrare, în ml;

b – diureza nictemerală, în ml.

Valoarea diagnostică. Hipouricuria se întîlneşte în nefrită, insuficienţă renală; hiperuricuria – în leucemie granulocitară, în degradarea intensă a nucleoproteidelor, gută, consumul de alimente bogate în purine.

Experienţa 4. ***Identificarea acidului homogentizinic în urină.***

Principiul metodei. Acidul homogentizinic, interacţionînd cu reactivul molibdenic, formează un complex colorat în albastru.

Mod de lucru. Se iau două eprubete. În prima se introduc 2 picături de urină colectată de la un om sănătos, iar în a doua – 2 picături de urină colectată de la un om bolnav de alcaptonurie. În fiecare eprubetă se mai adaugă cîte 10 picături de apă, 4 picături soluţie de fosfat de potasiu de 10 %, 4 picături de reactiv molibdenic. Conţinutul eprubetelor se agită. În eprubeta cu urină patologică soluţia se colorează în albastru.

Importanţa clinico-diagnostică. Acidul homogentizinic se determină în urină în alcaptonurie.

Teme pentru autopregătire

1. Metabolismul fenilalaninei, tirozinei şi triptofanului. Rolul acestor aminoacizi în sinteza altor compuşi.
2. Metionina. S-Adenozilmetionina. Rolul acestui aminoacid în organism. Sinteza creatinei.
3. Acidul tetrahidrofolic. Rolul lui în sinteza serinei, metioninei, glicinei, timinei.
4. Metabolismul glicinei, serinei şi cisteinei.
5. Metabolismul aminoacizilor dicarboxilici.
6. Glutamina şi rolul ei în organism; glutaminaza rinichilor.
7. Patologia metabolismului proteic. Tulburările congenitale ale metabolismului aminoacizilor.

Întrebări pentru autocontrol

1. Amoniacul se formează în urma dezaminării: a) aminoacizilor; b) glutamatului; c) glutaminei; d) bazelor azotate; e) noradrenalinei.
2. Glicina participă la sinteza: a) serinei; b) creatinei; c) nucleotidelor purinice; d) hemului; e) combinaţiilor conjugate.
3. Serina este folosită de organism la formarea: a) fosfatidilserinei; b) etanolaminei; c) piruvatului; d) glicinei; e) fosfoproteidelor.

4. Cisteina formează: a) cistină; b) glutation; c) piruvat; d) cisteamină; e) acid cisteinic.

5. S-Adenozilmetionina este utilizată la sinteza: a) fosfatidilcolinei; b) creatinei; c) timinei; d) adrenalinei; e) N-metilnicotinamidei.

6. Glutamina ia parte la sinteza: a) nucleotidelor purinice; b) nucleotidelor pirimidinice; c) aminozaharurilor; d) NAD-ului; e) carbamoilfosfatului.

7. Din tirozină se formează: a) serotonina; b) tiroxina; c) catecolaminele; d) melanina; e) fenilalanina.

8. La om se întîlnesc următoarele tulburări congenitale ale metabolismului proteic: a) fenilcetonuria; b) albinismul; c) alcaptonuria; d) boala siropului de arțar; e) afecțiunea Hartnup.

9. Scrieți ecuația stoichiometrică pentru sinteza glucozei din aspartat.

10. Scrieți ecuația stoichiometrică a transformării aspartatului în oxaloacetat prin fumarat.

11. Scrieți ecuația stoichiometrică pentru sinteza alaninei din glucoză.

12. În timpul contracțiilor musculare are loc scăderea concentrației creatinfosfatului fără schimbarea concentrației ATP-ului. Explicați de ce.

TEMA 24

Metabolismul nucleotidelor. Chimia şi metabolismul cromoproteidelor

Experiența 1. ***Identificarea pigmenților sanguini în lichidele biologice*** (*proba cu benzidina*).

Pigmentul sanguin se poate elimina cu urina sub formă de :

- hemoglobina conținută în structura eritrocitului – *hematurie*;
- hemoglobina liberă – *hemoglobinurie*.

În primul caz în sediment se depistează structuri hematice.

Principiul general al metodelor chimice pentru recunoaşterea sîngelui se bazează pe activitatea peroxidazică a hemoglobinei. Sub acțiunea pigmentului sanguin, apa oxigenată este descompusă punînd în libertate oxigen atomar activ capabil să oxideze anumite substanțe, care își modifică culoarea.

Experiența 2. ***Determinarea bilirubinei în serul sanguin*** (*metoda Jendrassik*).

Principiul metodei. Bilirubina cu diazoreactivul, în prezența cofeinei, formează un compus complex colorat în roșu-purpuriu.

Mod de lucru. În trei eprubete (control, bilirubina totală, bilirubina conjugată) se introduc reactivii (în ml) conform tabelului de mai jos.

Numărul eprubetei	I	II	III
Reactivul	Bilirubina totală (ml)	Bilirubina conjugată (directă) ml	Proba de control (ml)
Ser sanguin	0,5	0,5	0,5
Reactiv cofeinic	1,75	-	1,75
Soluție NaCl de 0,9%	-	1,75	0,25
Diazoreactiv	0,25	0,25	-

Pentru dezvoltarea colorației și determinarea bilirubinei totale, prima eprubetă se lasă în repaus și se colorimetrează. Pentru determinarea bilirubinei conjugate (eprubeta II), colorimetrarea se face peste 5-10 minute. La fotocolorimetrare se va folosi filtru de lumină verde, cuva de 5 mm față de control.

C a l c u l u l se face după curba etalon.

Pentru determinarea bilirubinei neconjugate (indirecte, libere), din bilirubina totală se scade bilirubina conjugată (directă).

Valorile normale: bilirubina totală – 8,55-20,52 mM/l (0,5-1,2 mg/100); bilirubinei libere (indirecte) îi revin 75% din bilirubina totală.

Valorile medii ale diferitelor fracții de bilirubină: bilirubina totală – 11,1 mM/l (0,65 mg/100 ml); bilirubina conjugată (directă) – 2,6 mM (0,15 mg/100 ml); bilirubina liberă (indirectă) – 8,6 mM/l (0,5 mg/100 ml).

Experiența 3. ***Proba cu timol*** (*Huergo-Popper*).

Principiul metodei. La reacția serului sanguin cu soluție tampon timol-veronal apare o opalescență ca rezultat al formării complexului lipid-globulinic.

Mod de lucru. La 6 ml de soluție tampon timol-veronal se adaugă 0,1 ml de ser sanguin. După 30 minute se determină extincția la FEC la lungimea undei de lumină 630-690 nm; filtrul de lumină roșie, contra soluției tampon timol-veronal.

C a l c u l u l se face după curba etalon.

Valorile normale: 0 - 4 unităţi de opalescenţă.

Importanţa clinico-diagnostică. Proba cu timol pozitivă (valoarea mai mare de 4 unităţi) indică creşterea conţinutului de globuline. Se observă în boala Botkin (90-100 cazuri), hepatopatii toxice, ciroză hepatică, colagenoze ş. a. În icterul mecanic fără complicaţii, cu hepatită parenchimatoasă, proba este negativă.

Teme pentru autopregătire

1. Digestia şi absorbţia acizilor nucleici.
2. Degradarea nucleotidelor purinice şi pirimidinice în ţesuturi. Guta.
3. Biosinteza nucleotidelor purinice, reglarea.
4. Biosinteza nucleotidelor pirimidinice, reglarea.
5. Structura chimică şi rolul biologic al cromoproteidelor.
6. Digestia şi absorbţia cromoproteidelor. Principiul reacţiilor de identificare a hemoragiilor oculte din tractul digestiv, urină.
7. Catabolismul hemoglobinei în ţesuturi. Legătura dintre pigmenţii sanguini, biliari, urinari şi ai maselor fecale. Importanţa determinării lor în diagnosticul şi diferenţierea icterelor.
8. Metabolismul fierului în organism.
9. Biosinteza hemului. Reglarea procesului.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Drept sursă de sinteză de novo a nucleotidelor purinice servesc: a) glutamina; b) glicina; c) aspartatul; d) formiatul; e) oxidul de carbon.
2. Cum decurge sinteza nucleotidelor purinice din produse gata?
3. Fluoruracilul se transformă în celulă în fluordezoxiuridilat, care prezintă inhibitorul viguros al timidilatsintetazei. De ce fluoruracilul inhibă creşterea celulelor canceroase, care se divizează rapid la animalele experimentale?
4. În chimioterapia tumorilor este larg utilizat preparatul medicamentos metotrexatul. Care este mecanismul lui de acţiune?
5. Azaserina este un inhibitor puternic al enzimei amidotransferaza, care în procesul de sinteză al nucleotidelor purinice catalizează transportul grupării amino de la glutamină la acceptorul corespunzător. Dacă celulele sunt tratate cu azaserină, ce produs intermediar al biosintezei nucleotidelor purinice se acumulează?

6. Scrieţi ecuaţia stoichiometrică pentru sinteza dTMP din dUMP, cuplată cu transformarea serinei în glicină.

7. Prin care produse intermediare are loc includerea azotului liber în biosinteza hemului?

8. Masa moleculară a proteinelor este mult mai mare decît masa moleculară a substanţelor organice. Se ştie că în componenţa hemoglobinei intră 0,34% fier. Calculaţi masa moleculară minimă a hemoglobinei. Experienţele moderne au arătat că masa moleculară a hemoglobinei este egală cu 645000. Calculaţi cîţi atomi de fier conţine o moleculă de hemoglobină.

9. Bolnavul este icteric, masele fecale şi urina au o culoarea intens oranj. Bilirubina serică este majorată şi se identifică prin reacţie indirectă. Stabiliţi diagnosticul prezumtiv. Motivaţi răspunsul.

TEMA 25

Colocviu la temele: Metabolismul lipidelor, proteinelor, nucleotidelor şi cromoproteidelor

CAPITOLUL VII

Hormonii

Hormonii sunt substanţe chimice elaborate de celule specializate care pe calea sanguină ajung la organele sensibile (ţesuturi ţintă), unde exercită acţiuni reglatoare asupra proceselor metabolice. Celulele specializate în elaborarea hormonilor sunt grupate în unităţi anatomice distincte – glandele endocrine.

Clasificarea hormonilor

Structural se disting trei grupe principale de hormoni:

1. Hormonii peptidici (hormonii hipofizari, paratiroidieni, pancreatici). Sunt un grup heterogen ca structură, cuprinzînd de la mici peptide cu cîţiva aminoacizi (nonapeptide - hormonii neurohipofizari) pînă la macroproteine (hormonul de creştere are 191 de aminoacizi).

2. Hormonii derivaţi din aminoacizi. Sunt substanţe monoaminice. Tirozina stă la originea producerii diferenţiate a adrenalinei, noradrenalinei, dopaminei şi a hormonilor tiroidieni.

3. Hormonii steroizi. Sunt derivaţi ai colesterolului. Din acest grup fac parte hormonii sexuali şi cei elaboraţi de cortexul suprarenal.

Activitatea sistemului endocrin este reglată la nivelul de producere al hormonului şi la nivelul de receptor specific tisular.

Reglarea la nivelul de producere se efectuează prin mecanismul feed-back (retrocontrol), bioritm şi influenţă neurogenă.

Reglarea secreţiei prin mecanismul feedback reprezintă modalitatea prin care produşii hormonali îşi modulează propria sinteză şi secreţie, acţionînd asupra structurilor implicate în producerea lor. Rata secreţiei hormonilor periferici reglează funcţional etajul superior de control (hipotalamo-hipofizar) sub aspectul sintezei şi secreţiei hormonilor hipofizari după modelul retro-controlului ("feedback") cu efect secretor pozitiv (în cazul scăderii nivelului seric al hormonului) sau cu efect secretor negativ (în cazul creşterii nivelului seric al aceluiaşi hormon). Bioritmurile hormonale sunt înnăscute, dar suferă o sincronizare sub influenţa factorilor de mediu. Bioritmurile sunt ultradiene (periodicitate de minute - ore: secreţia pulsatilă a gonadotropinelor), circadiene (periodicitate de 24 ore: secreţia cortizolică).

Reglarea neurogenă este asigurată de "traductori neuroendocrini" (hipotalamus, medulosuprarenală, glanda pineală, pancreas). Se asigură o reglare în cascadă, centrii superiori de control folosind cantităţi mult mai mici decît cele ce reprezintă răspunsul periferic al glandelor ţintă.

Reglarea la nivel tisular se efectuează prin modificarea sensibilităţii receptorilor în sens negativ (reductiv) sau pozitiv (amplificat). Este vorba de *down regulation* şi respectiv *up regulation*.

Transportul. Hormonii hidrofili (peptidici, catecolaminele) circulă sub formă liberă. Excepţie fac somatomedinele, corticoliberina şi hormonul de creştere. Hormonii hidrofobi (tiroidieni, steroizi) circulă preponderent legaţi de proteine, numite proteine de transport (albuminele, prealbuminele, transcortina, globulina tiroxinoliantă).

Hormonii îşi îndeplinesc rolul lor metabolic în mod diferenţiat, în funcţie de structura lor: peptidele şi catecolaminele activează enzime preformate; steroizii şi hormonii tiroidieni stimulează sinteza proteică. Activitatea lor se desfăşoară graţie receptorilor membranari (pentru hormonii peptidici şi catecolamine), respectiv receptorilor celulari (pentru hormonii steroizi şi hormonii tiroidieni).

Receptorii membranari răspund la impactul hormonal prin tranziţii conformaţionale care sunt preluate şi transmise unor sisteme intermediare intracelulare. Semnalul primar extracelular mesager-prim – hormonul – se transformă într-un răspuns intracelular prin intermediul mesagerului secund – AMP ciclic, Ca^{2+}, inozitol, oxidul de azot. Varietatea de efecte intracelulare determinate de diverşi hormoni se datorează multiplicităţii moleculare a adenil-ciclazelor, a sistemului alosteric de kinaze care fosforilează proteine specifice, comutîndu-le în forme catalitic active. Proteinele prin fosforilare suferă tranziţii conformaţionale care alterează funcţii specifice.

Reglarea hormonală se realizează prin modificări ale activităţii catalitice a enzimelor celulare preexistente sau prin variaţii ale sintezei de proteine enzimatice, sau poate fi şi alterarea permeabilităţii membranelor celulare pentru unii ioni sau metaboliţi. Astfel, se prezintă mecanismul general de acţiune al hormonilor ce nu pătrund în celulă.

Moleculele steroizilor de dimensiuni mici şi cu polaritate redusă străbat membranele celulare şi în citozol interacţionează cu receptorii celulari. Complexul receptor-steroid pătrunde în nucleu şi este fixat de anumite structuri

nucleare. La acest nivel se controlează sinteza de ARN mesager (creşte concentraţia, durata vieţii biologice sau creşte eficienţa de utilizare a ARN-ului mesager).

Dozarea hormonilor se poate face prin metode biologice, chimice, imunologice. Dozarea biologică este foarte sensibilă, dar nespecifică, deoarece aceleaşi efecte tisulare sunt reproduse şi de alte molecule. Metodele chimice tradiţionale sunt puţin sensibile pentru concentraţia la care hormonii există în sînge şi îşi exercită rolul fiziologic. Metodele moderne de imunodozare, tehnici foarte sensibile şi specifice sunt: radioimunodozarea (RIA, Benson &Yellow, premiul Nobel 1977), metoda imunometrică (IRMA) cu anticorpi monoclonali multipli (are sensibilitate şi specificitate maximă).

Principiul RIA constă în marcarea hormonului cu un izotop şi competiţia pentru anticorpul specific între hormonul marcat şi cel nemarcat. Determinînd cu un autogammaspectrometru emisia radioactivă a hormonului marcat liber în raport cu hormonul marcat legat (separarea lor se face prin precipitare cu al 2-lea anticorp - antigamaglobulină), se trasează o curbă standard faţă de care se calculează concentraţia hormonului din proba biologică. RIA necesită cantităţi mici (0,3 mL lichid biologic) pentru o determinare, fiind o metodă sensibilă şi specifică.

TEMA 26

Hormonii. Rolul biologic. Clasificarea, mecanismele de acţiune. Mecanismele umorale de reglare a metabolismului. Hormonii hipofizei, hipotalamusului, glandei paratiroide

Experienţa 1. ***Dozarea fosforului anorganic din serul sanguin.***

Principiul metodei. Ionul PO_4^{3-} formează cu molibdatul de amoniu în soluţie acidă fosfomolibdatul de amoniu care fiind tratat cu acid ascorbic formează un complex de culoare albastră. Intensitatea culorii este proporţională cu cantitatea de fosfor din proba de cercetat.

Mod de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se iau cu pipeta 1 ml de ser sangvin, 4 ml de apă distilată şi 5 ml soluţie de acid tricloracetic de 10%. După 10 minute proba se centrifughează. La 5 ml centrifugat se adaugă 1 ml soluţie de molibdat de amoniu ce conţine acid sulfuric, 0,2 ml soluţie de acid ascorbic de 1% preparată în soluţie de HCl de 0,1N şi 1,8 ml de apă

distilată. După 20 minute de repaus la temperatura camerei, se citeşte extincţia probei la fotocolorimetru. Citirile se fac în cuva de 1cm la filtrul de lumină roşu contra probei de control.

Proba de control se face la fel ca şi cea de experienţă, numai că în loc de centrifugat se iau 2,5 ml soluţie de acid tricloracetic de 10% şi 2,5 ml apă distilată.

Valoarea extincţiei probei experimentale este raportată la curba etalon.

Valorile normale ale fosforului anorganic sunt 0,58-0,84 mM/l (1,8–2,6 mg/100 ml).

Valoarea diagnostică. Fosforul mineral sanguin scade în hiperparatiroidism şi creşte în insuficienţă renală, hipoparatiroidism, acromegalie, diabet, spasmofilie.

Teme pentru autopregătire

1. Noţiuni despre hormoni. Proprietăţile generale şi rolul hormonilor în organism.

2. Clasificarea hormonilor.

3. Sinteza, transportul, stocarea şi metabolizarea hormonilor:

a) polipeptidici;

b) steroizi;

c) catecolaminelor;

d) tiroidieni.

4. Mecanismele de reglare a sintezei, excreţiei şi acţiunii hormonilor:

a) conceptul sistemelor de reglare prin feed-back;

b) bioritmuri hormonale.

5. Structura receptorilor membranari şi nucleari. Interacţiunile dintre hormon şi receptor.

6. Mecanismele de acţiune ale hormonilor:

a) mecanismul membrano-intracelular. Rolul mesagerilor secunzi: AMPciclic, GMPciclic, ionii de calciu, diacilglicerolul şi inozitoltrifosfatul, oxidul de azot;

b) mecanismul citozolic.

7. Hormonii hipotalamusului: liberinele şi statinele. Reglarea secreţiei lor.

8. Hormonii adenohipofizari:

a) peptide derivate din pro-opiomelanocortină;

b) grupa hormonilor somatotropi;

c) grupa hormonilor glicoproteici.

Natura chimică, mecanismul de acţiune, efectul biologic, reglarea secreţiei şi dereglarea ei. Utilizarea practică.

9. Hormonii neurohipofizari: vazopresina (hormonul antidiuretic) şi oxitocina. Mecanismul de acţiune, efectele biologice. Diabetul insipid.

10. Hormonii glandei paratiroide: structura, reglarea şi efectele biologice. Rolul 1,25$(OH)_2D_3$. Dereglările funcţiilor glandelor paratiroide.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. La baza mecanismului de acţiune a hormonilor stau proprietăţile lor fizico-chimice. Elucidaţi mecanismul de acţiune asupra celulelor ţintă a hormonilor: somatotrop, adrenalinei şi estradiolului.

2. De ce administrarea cofeinei şi teofilinei măreşte concentraţia de 3′,5′- AMPc?

3. Depinde oare cantitatea de 3′,5′-AMPc în celulă de proteina fixatoare de calciu – calmodulina?

4. Care sunt cauzele poliuriei în diabetul zaharat şi nezaharat? Explicaţi mecanismele apariţiei şi indicaţi tratamentul necesar.

5. De ce endorfinele se consideră ca opiu propriu al organismului? În ce constau perspectivele folosirii lor?

6. Care este legătura vitaminei D cu hormonii reglatori ai metabolismului calciului şi fosforului în organism?

7. Mecanismul de acţiune al calcitoninei:

a) stimulează sau inhibă secreţia ionilor de calciu în oase;

b) măreşte sau micşorează concentraţia ionilor de calciu în sînge;

c) reglează menţinerea fosforului şi calciului prin intermediul rinichilor.

8. Acţiunea cărora din hormonii enumeraţi mai jos este mediată de 3′, 5′-AMPc:

a) corticotropină;

b) adrenalină;

c) insulină,

d) vasopresină;

e) tiroxină.

TEMA 27

Hormonii pancreasului şi glandei tiroide. Structura, biosinteza, rolul metabolic şi reglarea secreţiei lor

Experienţa 1. ***Dozarea calciului din serul sanguin.***

Principiul metodei constă în titrarea directă a ionilor de calciu în mediul alcalin cu sarea de sodiu a acidului etilendiamintetraacetic (EDTA) în prezenţa murexidului, utilizat ca indicator.

Mod de lucru. 2 ml de ser sangvin diluaţi cu 50 ml de apă distilată în balon de 250 ml, se titrează cu EDTA n/100 pînă la virajul violet. Paralel se titrează şi o probă în alb, folosind apă în loc de ser.

Formula de calcul: calciu, mg% = Nx50x0,2 mg, unde:

$N = n_1 - n_2$; n_1 - ml EDTA folosită la titrarea probei; n_2 - ml EDTA folosită la titrarea probei în alb. Prin metoda de mai sus se determină calciul total.

Valorile normale: 8-11mg/100 ml (2,0-2,75 mM/l).

Valoarea diagnostică. Valorile crescute se întîlnesc în hipervitaminoza D, hiperparatiroidism, reumatism etc. Valorile scăzute se întîlnesc în rahitism, tetanie, nefroze.

Experienţa 2. ***Identificarea tiroxinei.***

Principiul metodei. La scindarea tiroxinei se formează iodură de potasiu, din care se elimină iodul liber, care unindu-se cu amidonul, dă o coloraţie albastră.



$KI + KIO_3 + 6HCl \rightarrow 3I_2 + 6KCl + 3H_2O$



I_2 + amidon $\rightarrow$ coloraţie albastră

Mod de lucru. Într-o eprubetă obişnuită se introduc 20 picături de hidrolizat (ce conţine tiroxină) la care se adaugă 1ml de H_2SO_4 de 10%, 3 picături de amidon de 1% şi 7 picături de iodură de potasiu.

Experienţa 3. ***Studierea compoziţiei chimice a insulinei.*** Din punct de vedere chimic, insulina este un polipeptid format din 51 resturi de aminoacizi, legaţi între ei sub forma a două lanţuri prin două punţi disulfidice.

a)Reacţia biuretică.

Principiul metodei. Legăturile peptidice ale proteinelor în mediu alcalin reacţionează cu $CuSO_4$, formînd compuşi coloraţi în roşu-violet.

Mod de lucru. La 10 picături soluţie de insulină se adaugă 5 picături soluţie de NaOH de 10% şi 2 picături de sulfat de cupru de 1%. Eprubeta se agită. Apare culoarea violetă.

b) Identificarea sulfului (reacţia Fol).

Principiul metodei. La degradarea proteinelor şi peptidelor sub acţiunea hidroxidului de sodiu, din grupările sulfhidril se eliberează sulful sub formă de sulfură de sodiu care, reacţionînd cu plumbitul de sodiu, formează precipitatul de sulfură de plumb de culoare brună.

Mod de lucru. La 5 picături soluţie de insulină se adaugă 5 picături soluţie de reactiv Fol. După 1 - 2 minute de fierbere apare un precipitat brun, format din sulfură de plumb.

Teme pentru autopregătire

1. Hormonii glandei tiroide. Biosinteza şi secreţia hormonilor tiroidieni.
2. Transportul şi metabolismul hormonilor glandei tiroide.
3. Reglarea funcţiei tiroidiene. Acţiunea hormonilor tiroidieni. Consecinţele metabolice ale acţiunilor celulare ale hormonilor tiroidieni.
4. Dereglările funcţiei glandei tiroide şi metodele de tratament (hiper- şi hipotiroidia).
5. Hormonii pancreasului. Structura, biosinteza şi reglarea secreţiei hormonilor pancreatici.
6. Transportul şi inactivarea insulinei. Formele de insulină în sînge.
7. Mecanismele de acţiune şi efectele metabolice ale insulinei şi glucagonului.
8. Sinteza în laborator a insulinei. Preparatele farmaceutice şi folosirea lor.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. În ce constă importanţa biologică a sintezei hormonilor sub formă de prohormoni şi preprohormoni?
2. Cum se poate explica faptul că la incubarea ţesuturilor ficatului cu tiroxină intensitatea respiraţiei şi termogeneza creşte, dar concentraţia de ATP nu se modifică?
3. Funcţia somatostatinei secretată de hipotalamus şi glanda pancreatică. Se poate folosi acest hormon în tratamentul unor forme de diabet zaharat?
4. În caz de hiperinsulinism se pot întîlni dereglări ale sistemului nervos. Explicaţi mecanismul apariţiei lor.
5. Care este geneza cetonemiei, cetonuriei, hiperglicemiei şi glucozuriei în caz de diabet zaharat?

6. La unul din doi bolnavi cu insuficienţă hipofizară se observă debilitate mintală. Care sunt cauzele patologiei?

TEMA 28

Hormonii suprarenalei. Structura, rolul metabolic, biosinteza şi reglarea secreţiei lor. Hormonii sexuali. Hormonoizii

Experienţa 1. ***Reacţiile de identificare a adrenalinei.***

a) Reacţia cu clorura de fier.

Principiul metodei. La interacţiunea adrenalinei cu clorura de fier (III) apare culoarea verde. Această reacţie este caracteristică pentru inelul pirocatehinic din componenţa adrenalinei şi noradrenalinei.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 10 picături soluţie de adrenalină de 0,1% şi se adaugă o picătură soluţie de clorură de fier de 1%. La adăugarea a trei pucături de soluţie de hidroxid de sodiu de 10%, se observă o coloraţie roşie-vişinie.

b) Diazoreacţia. La interacţiunea adrenalinei cu diazoreactivul, soluţia se colorează în roşu ca urmare a formării unei combinaţii de tipul azocoloranţilor.

Mod de lucru. La 6 picături soluţie de acid sulfanilic de 0,5% se adaugă 6 picături soluţie de nitrit de sodiu de 0,5%. La diazoreactivul obţinut se adaugă 10 picături soluţie de adrenalină de 0,1% şi trei picături soluţie de hidroxid de sodiu de 10%. Lichidul se colorează în roşu.

Experienţa 2. ***Reacţia de identificare a 17-cetosteroizilor în urină.***

Principiul metodei. 17-cetosteroizii în mediul alcalin reacţionează cu m-dinitrobenzenul cu formare de produse de condensare de culoare roz-violetă.

Mod de lucru. Identificarea 17-cetosteroizilor se face *numai în eprubete şi pipete uscate.*

La 20 picături de urină se adaugă 30 picături soluţie alcoolică de m-dinitrobenzen de 2%. Eprubeta se agită şi se adaugă 6 picături soluţie de hidroxid de sodiu de 30%. Apare o coloraţie roz-violetă.

Teme pentru autopregătire

1. Hormonii medulosuprarenali (adrenalina şi noradrenalina). Biosinteza, secreţia şi metabolizarea lor.

2. Mecanismul de acţiune şi efectele fiziologice ale catecolaminelor. Feocromocitomul.

3. Hormonii corticosuprarenali: cortizolul şi aldosteronul. Structura şi etapele biosintezei de glucocorticoizi şi mineralocorticoizi.

4. Transportul în plasmă, metabolismul şi excreţia hormonilor steroizi corticosuprarenali.

5. Reglarea secreţiei de glucocorticoizi şi mineralocorticoizi.

6. Mecanismul general de acţiune a steroizilor corticosuprarenali.

7. Acţiunile biologice ale glucocorticoizilor. Rolul adaptiv în stres.

8. Efectele hormonilor mineralocorticoizi.

9. Tulburările secreţiei hormonilor corticosuprarenali (boala Addison; sindromul suprarenometabolic; boala Cohn).

10. Hormonii sexuali masculini. Structura, transportul plasmatic şi metabolismul testosteronului.

11. Mecanismul de acţiune şi efectele fiziologice ale androgenilor.

12. Controlul hipotalamo - hipofizar al secreţiei de androgeni testiculari.

13. Hormonii sexuali feminini. Secreţia hormonală a ovarului, transportul plasmatic şi metabolismul estrogenilor şi progesteronului.

14. Controlul hormonal al funcţiei ovariene.

15. Acţiunile estrogenilor şi progesteronului.

16. Steroizii anabolizanţi ca preparate farmaceutice active.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. În caz de stres adrenalina stimulează scindarea glicogenului în ficat şi în muşchi. Produsul final de scindare în ficat este glucoza, iar în muşchii scheletici glicogenul se include în glicoliză. De ce produsele finale de scindare a glicogenului în aceste două ţesuturi sunt diferite?

2. Care sunt principiile şi mecanismul de dezvoltare a diabetului steroid?

3. Toxina holerică provoacă pierderi de apă şi ioni de Na^+. Cum toxina acţionează asupra concentraţiei de 3′,5′-AMPc în celulele intestinului? Tactica de tratament.

4. Explicaţi apariţia hiperpigmentaţiei tegumentelor în boala Addison.

5. În practica oncologică, ca tratament suplimentar, se recomandă prescrierea hormonilor sexuali de sex opus. Explicaţi principiile biochimice ale acestui tratament.

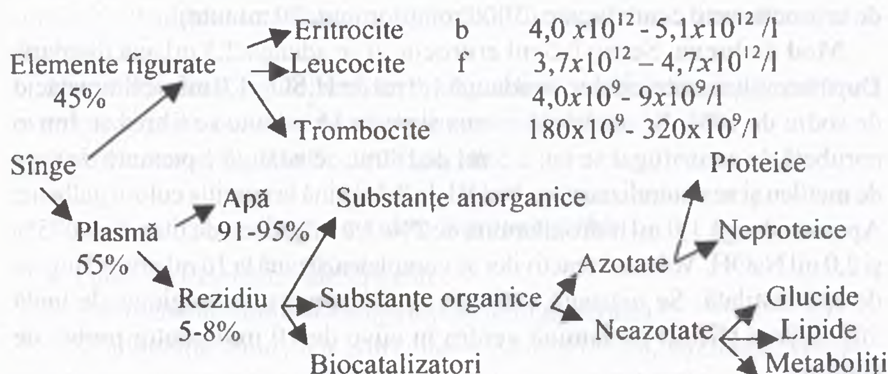
CAPITOLUL VIII

Biochimia sîngelui

Sîngele reprezintă 5-7,5% din greutatea corpului şi alcătuieşte la adult un volum total de 4,5-5,0 litri, adică 65-76,7ml/kilocorp. Sîngele este un ţesut lichid alcătuit din elemente figurate (eritrocite, leucocite, trombocite) suspendate în plasmă (vezi schema de mai jos).

Plasma (de la gr. *plasmă* - formaţie) este o soluţie apoasă de proteide şi săruri minerale, tamponată la pH=7,35. Ea reprezintă 55% din sîngele total şi diferă din punct de vedere fizico-chimic de acesta.

Hematiile (eritrocitele) reprezintă 44% din sîngele total, restul 1% - celelalte elemente figurate ale sîngelui.



Partea lichidă a sîngelui, care rămîne după îndepărtarea cheagului (format din celulele sanguine şi fibrinogen), se numeşte *ser*. Serul conţine macromolecule coloidale, în care predomină proteinele de tip albuminic, separate cu lichide şi glucide, precum şi molecule mici, organice şi minerale. Spre deosebire de plasmă, serul nu conţine fibrinogen. Pentru obţinerea plasmei, sîngele se recoltează cu anticoagulant şi apoi se centrifugează, ea constituind supernatantul. Deci, plasma reprezintă ser + fibrinogen şi alţi factori de coagulare.

Sîngele, împreună cu sistemul nervos, asigură legătura dintre toate organele organismului. Astfel, orice modificare a compoziţiei sîngelui semnalează o tulburare a stării fiziologice normale, deci, o stare patologică. De aceea analiza de laborator a sîngelui are o deosebită semnificaţie pentru diagnosticul bolii.

Pentru analizele de laborator se poate folosi sîngele total, plasma sau serul după felul analizelor solicitate de către medicul clinician.

TEMA 29

Biochimia sîngelui. Metabolismul elementelor figurate ale sîngelui

Experienţa 1. ***Determinarea cantitativă a ionilor de magneziu în eritrocite.***

Principiul metodei. Ionul de magneziu în mediu bazic formează cu colorantul organic galbenul de titan, un complex colorat în roşu. Intensitatea culorii este direct proporţională cu concentraţia ionilor de magneziu. Determinarea magneziului se realizează după separarea plasmei sanguine de eritrocite prin centrifugare (3000 rotaţii/minut, 30 minute).

Mod de lucru. Se iau 0,5 ml eritrocite şi se adaugă 2,5 ml apă distilată. După hemoliza eritrocitelor, se adaugă 1,0 ml de H_2SO_4, 1,0 ml wolframatacid de sodiu de 10%. Se amestecă intens şi peste 15 minute se filtrează. Într-o eprubetă de centrifugat se iau 2,5 ml de filtrat, se adaugă 1 picătură de roşu de metilen şi se neutralizează cu NaOH de 0,2N pînă la apariţia culorii galbene. Apoi se adaugă 1,0 ml hidroxilamină de 2%, 1,0 ml galben de titan de 0,075% şi 2,0 ml NaOH. Volumul reactivilor se completează pînă la 10 ml prin adăugare de apă distilată. Se măsoară extincţia la colorimetru la lungimea de undă 500-560nm (filtrul de lumină verde) în cuve de 10 mm contra probei de control.

Proba de control se face la fel ca şi proba de cercetat, numai că în loc de filtrat se ia apă distilată.

Valoarea extincţiei probei de cercetat este raportată la curba etalon.

Valorile normale: bărbaţi 1,95 ± 0,19 mM/l
femei 2,03 ± 0,21 mM/l

Valoarea diagnostică. Valori scăzute se întîlnesc în vărsături incoercibile şi diaree accentuată, aldosteronism primitiv, ciroze hepatice, comă diabetică, tetanie, rahitism infantil, epilepsie, pancreatită acută, mixedem.

Valori crescute se întîlnesc în insuficienţa renală acută şi cronică, boala Addison, hipertiroidism.

Experienţa 2. ***Determinarea glutationului redus.***

Principiul metodei. Glutationul interacţionează cu nitroprusiatul de sodiu, formând un complex colorat în roşu-violet. Intensitatea coloraţiei este direct proporţională cu cantitatea de grupe tiol-reactive, din care în filtratul aproteic predomină glutationul.

Mod de lucru. 0,5 ml de masă eritrocitară se triturează cu 5,0 ml de acid sulfosalicilic şi se toarnă într-un cilindru gradat. În mojar se mai adaugă 5,0 ml de acid sulfosalicilic, se triturează şi se toarnă în cilindru. Volumul lichidului este completat cu acid sulfosalicilic pînă la 15 ml şi se incubează timp de 15 minute. Amestecul se filtrează, se iau 3,0 ml de filtrat într-o eprubetă care se pune în baia de apă la 10°C. Se adaugă 2,0 ml amestec de K_2CO_3-NaCN şi 2,0 ml de nitroprusiat de sodiu. Exact peste 2 minute se determină densitatea optică a soluţiei la 526 nm faţă de control. Controlul conţine: 3,0 ml acid sulfosalicilic, 2,0 ml K_2CO_3-NaCN şi 2,0 ml nitroprusiat de sodiu.

Cantitatea glutationului se determină conform curbei etalon şi se exprimă în grame la gram de proteine sau hemoglobină (Hb).

Valorile normale: 0,002-0,003 g/g Hb.

Teme pentru autopregătire

1. Funcţiile fiziologice ale sîngelui.

2. Componenţa chimică a sîngelui (noţiuni generale).

3. Compoziţia chimică a eritrocitelor: hemoglobina, enzimele, componentele organice nehemoglobinice şi componentele minerale.

4. Metabolismul eritrocitului matur, caracteristicele particulare:

a) glicoliza şi ciclul fosfogliceratului. Reglarea acestor căi metabolice. Semnificaţia biologică a 2,3-difosfogliceratului;

b) calea ciclului pentozofosfat;

c) particularităţile metabolismului energetic. Sinteza ATP;

d) utilizarea O_2 în eritrocite.

5. Compoziţia chimică şi particularităţile metabolice ale populaţiei leucocitare din sîngele periferic. Afecţiunile ereditare ale leucocitului.

6. Compoziţia chimică, particularităţile metabolice şi funcţiile trombocitelor. Patologia biochimică a trombocitului.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. În sîngele conservat, concentraţia ATP se micşorează după prima săptămînă. Explicaţi mecanismele biochimice ce duc la diminuarea nivelului ATP-lui în sîngele conservat.

2. Unul din produşii finali ai ciclului pentozofosfaţilor este NADPH. Ce importanţă are acest produs pentru biologia eritrocitului?

3. Funcţia principală a granulocitului neutrofil este apărarea organismului de infecţii prin fagocitoză. Fagocitoza este un proces complex constituit din trei etape: leucotaxia, fagocitoza propriu-zisă şi bactericidia. Care sunt mecanismele biochimice ale bactericidiei?

4. În trombocite conţinutul de ATP este de 150 de ori mai mare decît în eritrocite. De ce? Explicaţi.

TEMA 30

Biochimia sîngelui. Componenţa chimică a plasmei sanguine. Ionograma. Echilibrul acido-bazic

Experienţa 1. ***Determinarea concentraţiei de proteină totală în plasma (serul) sanguină prin metoda refractometrică*** (vezi tema nr. 3, exp. 5).

Experienţa 2. ***Determinarea azotului rezidual din serul sanguin cu hipobromit*** (*metoda Rappoport-Eihorn*).

Principiul metodei. Proteinele din serul sanguin sunt sedimentate. Compuşii azotaţi din filtratul aproteic sunt trataţi cu soluţie bazică de hipobromit, excesul căruia se determină prin titrare iodometrică.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se indroduc 1 ml de apă distilată, 0,1 ml ser sanguin şi 4 ml de agent de precipitare (reactivul nr. 1), se amestecă şi peste 15 minute se filtrează printr-un filtru umectat în prealabil cu apă.

Într-un păhărel sau balonaş se iau 4 ml de filtrat, se adaugă 5 ml soluţie de lucru de hipobromit, conţinutul se agită şi se lasă în repaus timp de 1-2 minute. Se adaugă 0,2 ml soluţie de KJ de 10%, 3ml soluţie de HCl de 18%. Conţinutul se agită şi se titrează cu soluţie de tiosulfat de sodiu de 0,005N pînă la culoarea slab galbenă. Se adaugă 2-3 picături de soluţie de amidon de 0,25% şi se continuă titrarea pînă la decolorarea soluţiei.

Paralel cu proba de cercetat se efectuează proba de control, care conţine

4 ml agent de precipitare, 5 ml hipobromit, 0,2 ml soluţie de KJ de 10%, 3 ml soluţie de HCl de 18%. Proba de control se titrează ca şi proba de analizat.

Pentru determinarea conţinutului de azot rezidual, diferenţa, în ml, de tiosulfat consumat la titrarea probei de control *(C)* şi celei de analizat *(A)* se multiplică cu coeficientul 21,42. Rezultatul se obţine în mM/l:

$(C - A) \cdot 21,42$ = *azot rezidual* (mM/l)

Valoarea normală a azotului rezidual al sîngelui este de 14,28-28,56 mM/l (20-40 mg/100 ml).

Importanţa clinico-diagnostică. Azotemia (creşterea azotului rezidual sanguin) poate fi relativă, când este condiţionată de deshidratare, şi absolută, fiind generată de retenţia reziduurilor azotate (tulburarea funcţiei excretoare a rinichiului) sau în urma formării lor intense (catabolismul proteic sporit în tuberculoză, ciroza hepatică, pneumonie francă, boli infecţioase însoţite de febră etc.) Micşorarea conţinutului de azot rezidual în sînge se observă în carenţa proteică.

Teme pentru autopregătire

1. Compoziţia sîngelui. Substanţele proteice azotate ale plasmei sanguine:

a) Proteinele plasmatice. Albuminele, globulinele (fibrinogenul, transferina, ceruloplasmina, haptoglobinele, imunoglobulinele, glico- şi lipoproteidele etc). Rolul, metodele de dozare şi separare a proteinelor. Variaţiile fracţiilor proteice în patologie.

b) Enzimele plasmatice. Clasificarea funcţională. Mecanismul disenzimiei plasmatice. Principalele enzime plasmatice cu valoare diagnostică.

c) Peptidele sanguine de valoare biologică (angiotensinele şi kininele).

2. Compuşii neproteici azotaţi ai plasmei sanguine. Azotul rezidual, fracţiile lui în normă şi patologie.

3. Compuşii organici neazotaţi ai plasmei sangvine. Importanţa determinării lor.

4. Componenţii plasmatici minerali. Rolul lor. Ionograma sîngelui.

5. Sistemele sangvine tampon. Noţiuni generale de echilibru acido-bazic (EAB), acidoze şi alcaloze. Principalii indici ai EAB.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Explicaţi şi motivaţi mecanismul apariţiei edemaţiei în următoarele boli: a) glomerulonefrită; b) inaniţie; c) afecţiuni hepatice.

2. Cum se va modifica valoarea şi fracţiile azotului rezidual (neproteic) din serul sanguin în următoarele afecţiuni: a) glomerulonefrită; b) comă hepatică. Motivaţi răspunsul.

3. Motivaţi scopul de prescriere a interferonului bolnavilor şi persoanelor sănătoase.

4. Explicaţi şi motivaţi direcţia modificării rezervei alcaline a sîngelui în următoarele stări ale echilibrului acido-bazic: a) acidoză respiratorie; b) acidoză metabolică; c) alcaloză respiratorie; d) alcaloză metabolică.

5. La internarea bolnavului D, rezultatele investigaţiilor biochimice indică creşterea activităţii plasmatice a următoarelor enzime: fosfataza alcalină, leucinaminopeptidaza, γ - glutamiltransferaza. La ce clasă se referă aceste enzime conform clasificaţiei funcţionale a enzimelor plasmatice? Despre afectarea cărui sistem ne vorbesc rezultatele investigaţiilor biochimice? Motivaţi răspunsul.

6. În urma examenului clinic la bolnavul A s-a presupus o afectare a muşchilor scheletici (distrofia musculară). Ce explorări enzimatice aţi recomanda pentru confirmarea diagnosticului? Cum se vor modifica valorile normale ale activităţii enzimelor respective? Indicaţi clasa fermenţilor respectivi conform clasificării contemporane a enzimelor.

7. Cum se vor modifica fracţiile proteice sanguine în ciroza hepatică şi în sindromul nefrotic? Motivaţi răspunsul.

8. Ce înţelegeţi prin noţiunea de proteinele fazei acute? Enumeraţi aceste proteine. Cum se modifică spectrul fracţiilor proteice din sînge în această fază a procesului inflamator?

TEMA 31

Mecanismele biochimice ale transportului şi schimbului de gaze în sînge. Hemostaza. Reglarea stării fluide a sîngelui

Experienţa 1. ***Determinarea activităţii protrombinice*** (*indicelui protrombinic*) ***a plasmei sanguine.***

Principiul metodei. În exces de tromboplastină şi conţinut optimal de

Ca^{2+}, timpul de formare a cheagului în plasmă depinde de activitatea factorilor complexului protrombinic II, IX, X. Pe această bază, în amestecul de reacţie se introduce tromboplastina tisulară şi $CaCl_2$. Ca sursă de factori ai complexului protrombinic serveşte plasma cercetată. Dacă în plasmă activitatea unuia sau a mai multor factori ai complexului protrombinic este redusă, atunci timpul formării cheagului este mai mare. Timpul de formare a cheagului creşte în prezenţa anticoagulanţilor (în special a heparinei) sau la reducerea conţinutului de fibrinogen în plasmă.

Mod de lucru. Într-o eprubetă cu pereţi subţiri se iau 0,2 ml soluţie de $CaCl_2$ de 0,05M şi 0,1 ml suspensie de tromboplastină. Amestecul se incubează în baia de apă la temperatura de 37°C timp de 30 secunde. Apoi în eprubetă se introduc 0,1ml de plasmă cercetată şi se porneşte cronometrul. După fiecare 12-15 secunde, eprubeta se înclină la 45° şi se fixează timpul apariţiei fibrelor sau cheagului de fibrină (timpul protrombinic). Analiza se repetă nu mai puţin de două ori. Diferenţa de timp în analizele paralele trebuie să difere nu mai mult de o secundă.

Rezultatul se exprimă sub formă de activitate protrombinică (indice protrombinic) a plasmei (APP):

$$APP = \frac{A}{B} 100\%,$$

unde: A – timpul protrombinic al plasmei sanguine a omului sănătos;
B – timpul protrombinic al plasmei sanguine cercetate.

Pentru determinarea timpului protrombinic, în fiecare zi se utilizează o serie nouă de tromboplastină a omului sănătos, timpul protrombinic al căreia este indicat pe eticheta flaconului. Dacă activitatea tromboplastinei este redusă (timpul protrombinic este mărit de două ori), se foloseşte suspensia de tromboplastină de 2%.

Valoarea normală. Activitatea medie a protrombinei plasmatice a omului sănătos este de 80-100%.

Experienţa 2. ***Determinarea timpului de recalcificare a plasmei sanguine.***

Principiul metodei. Determinarea timpului de recalcificare a plasmei sanguine la adăugarea unei cantităţi optime de $CaCl_2$.

Mod de lucru. Într-o eprubetă, instalată într-un pahar cu pereţi transparenţi, ce conţine apă cu temperatura de 37°C, se introduc 0,2 ml soluţie de $CaCl_2$ de 0,25M şi 0,1 ml soluţie de NaCl de 0,85%.

Peste 60 secunde, în eprubetă se adaugă 0,1 ml plasmă şi se porneşte cronometrul. Se determină timpul de coagulare a plasmei. Analiza se repetă de 2-3 ori.

Valoarea normală. Plasma omului sănătos, la adăugarea unei cantităţi optime de $CaCl_2$, se coagulează timp de 60-120 secunde.

Importanţa clinico-diagnostică. Micşorarea timpului de recalcificare a plasmei sanguine indică precoagularea sanguină, mărirea lui – hipocoagularea lui.

Experienţa 3. ***Determinarea timpului trombinic al plasmei sanguine.***

Principiul metodei. Se determină timpul trombinic de coagulare al plasmei sanguine la adăugarea trombinei cu activitate standard (15-18 sec). Trombina transformă fibrinogenul în fibrină fără participarea altor factori de coagulare.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 0,2 ml plasmă şi se introduce în baia de apă la 37°C. Peste 60 secunde se adaugă 0,2 ml tromboplastină şi imediat se cronometrează timpul. Se determină timpul de coagulare a plasmei. Analiza se repetă de 2-3 ori.

Valorile normale: 15-18 secunde.

Importanţa clinico-diagnostică. Creşterea timpului trombinic se observă în caz de afibrinogenemie, hipofibrinogenemie, disfibrinogenemie, în sindromul de coagulare intravasculară diseminată, fibrinoliză acută, în afecţiunile grave ale ficatului, în prezenţa inhibitorilor trombinei în sînge.

Experienţa 4. ***Metoda Rutberg de determinare a fibrinogenului.***

Principiul metodei. La interacţiunea fibrinogenului cu $CaCl_2$ are loc coagularea cu retracţia fibrinei.

Mod de lucru. Într-o eprubetă conică se ia 1 ml de plasmă transparentă şi se adaugă 0,1 ml soluţie de $CaCl_2$ de 5%, se agită. Peste 7-15 min, fibrina formată se înfăşoară pe o baghetă de sticlă şi se scoate din eprubetă. Fibrina se ia de pe bagheta de sticlă şi se usucă cu ajutorul hîrtiei de filtru pînă cînd aceasta rămîne uscată. Fibrina uscată se cîntăreşte.

Valorile normale: 9-15 mg (2-4 g/l sau 5,9-11,7 mM/l).

Notă. Pentru plasma umană, coeficientul de recalcificare este 0,222 în g/l sau 0,293 în mM/l.

Importanța clinico-diagnostică. Micşorarea cantității de fibrinogen se observă în caz de afibrinogenemie, hipofibrinogenemie, disfibrinogenemie, în afecțiunile grave ale ficatului, în sindromul de coagulare intravasculară diseminată, fibrinoliză acută.

Mărirea concentrației de fibrinogen în plasmă se observă în infecții, în procesele inflamatorii acute, tromboze, tromboembolii, în timpul graviditătii, după traume, naştere, operații.

Experiența 5. *Proba cu etanol.* Prin această metodă se pot determina derivații fibrinogenului: fibrina solubilă, fibrin-monomerii.

Principiul metodei. La interacțiunea fibrin-monomerilor cu fibrinogenul şi fibrina are loc eliberarea fibrin-monomerilor, care se polimerizează formînd gel. Se urmăreşte apariția gelului după adăugarea soluției de etanol de 50%.

Mod de lucru. Într-o eprubetă se iau 0,15 ml soluție etanol de 50% şi 0,5 ml plasmă. Eprubeta se agită şi se lasă la temperatura camerei. Dacă peste 1-10 minute în eprubetă se formează un gel, testul este pozitiv. Apariția unei tulburări sau a unor fulgi, grăuncioare se consideră drept probă negativă.

Importanța clinico-diagnostică. Testul pozitiv este un criteriu diagnostic de laborator important pentru sindromul de coagulare intravasculară diseminată sau tromboză masivă, însoțită de activarea sistemului fibrinolitic.

Teme pentru autopregătire

1. Hemoglobina – model ideal de proteină alosterică. Oxigenarea – deoxigenarea hemoglobinei. Modificările conformaționale ale hemoglobinei în aceste procese. Curba de oxigenare. Efectul Bohr.

2. Transportul O_2 şi CO_2 de către sînge. Mecanismul biochimic. Importanța hemoglobinei în aceste procese şi în menținerea constantă a pH-ului sangvin.

3. Noțiune de hipoxemie şi hipoxie. Cauzele apariției lor. Hemoglobinopatiile.

4. Hemostaza. Rolul trombocitelor, substanțelor biologic active,

vitaminei K, ATP-ului, ADP-ului, prostaglandinelor, kininelor, kalicreinelor conform mecanismelor de desfăşurare a hemostazei în următorii timpi:

a) timpul parietal – caracteristica generală;

b) timpul plasmatic – factorii principali ai coagulării, mecanismele intrinsec şi extrinsec de coagulare a sîngelui;

c) timpul fibrinolitic – sistemul anticoagulant, fibrinoliza.

5. Reglarea stării fluide a sîngelui.

6. Indicii fundamentali de definire a fazelor coagulării. Coagulograma.

7. Coagulopatiile. Noţiuni generale. Exemple.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Creşterea afinităţii hemoglobinei pentru oxigen este exprimată prin: a) creşterea P_{50}; b) scăderea P_{50}; c) P_{50} nu se modifică.

2. Specificaţi ce modificări se produc pe parcursul fixării oxigenului de hemoglobină:

a) pierderea unor aminoacizi;

b) ruperea unor punţi saline;

c) acumulare de apă;

d) ruperea unor punţi saline şi pierderea 2,3-DFG;

e) acumulare de 2,3-DFG şi ruperea de punţi saline;

f) formarea de punţi saline.

3. Specificaţi care este caracteristica “buzunarului hemic” al globinei, care asigură protecţia împotriva oxidării ireversibile a fierului din hemoglobină:

a) caracterul hidrofob al aminoacizilor care tapetează acest buzunar;

b) caracterul hidrofil al aminoacizilor care tapetează acest buzunar;

c) dimensiunea mică;

d) prezenţa histidinelor proximală şi distală (E_7 şi E_8).

4. Bolnavul a fost tratat timp îndelungat de o boală infecţioasă intestinală. La incizie ocazională a degetului s-a observat hemoragie prelungită. Prezumţia cauzei hemoragiei. Motivaţi răspunsul.

5. Se va deregla coagularea sîngelui şi din ce cauză în următoarele stări:

a) icter parenchimatos;

b) ciroză hepatică;

c) hipovitaminoza K.

Motivaţi răspunsul.

6. Din ce considerente pentru hemostază se efectuează transfuzia de sînge sau de plasmă nativă? Motivaţi răspunsul.

7. Cum se vor modifica indicii coagulogramei sangvine în hipo- şi hipercoagulare comparativ cu valorile normale. Construiţi un tabel.

TEMA 32

Colocviu la temele: Hormonii. Sîngele

TEMA 33

Biochimia ţesuturilor şi umorilor

a) Metabolismul mineral (apa şi sărurile minerale)

Componenţa fluidică a organismului este prezentată prin apă şi săruri minerale. Ultimele se găsesc în starea ionică cu realizarea unui echilibru între anioni şi cationi.

Apa formează 50 – 70% din greutatea corporală şi intră în componenţa tuturor celulelor. Ea îndeplineşte diferite funcţii:

– rol structural;
– mediul reacţiilor biologice;
– intervine prin H_3O^+ şi OH^- în reacţii de tamponare, hidroliză şi cataliză;
– formează soluţii adevărate şi coloidale;
– favorizează disocierea electrolitică a substanţelor;
– participă la reacţii de hidratare şi oxidare;
– intervine în procesul de termoreglare, avînd o căldură termică mare.

Deosebim apa *extracelulară* (20 – 25% din greutatea corporală), ce conţine cantităţi mari de ioni de Na^+, Cl^-, HCO_3^-, şi apa *intracelulară* (50% din greutatea corporală), ce conţine o cantitate mare de ioni de K^+.

Menţinerea volumului de H_2O la un nivel constant este asigurată de mai mulţi factori:

– sistemul nervos contribuie la menţinerea echilibrului hidric;
– apa se integrează prin senzaţia de sete;
– ficatul intervine la menţinerea echilibrului prin proteinele sintetizate;

– glandele endocrine reglează metabolismul hidro-mineral prin hormonii: vazopresină, aldosteron, hormoni tiroidieni, insulină;

– apa se elimină prin rinichi, plămîni şi respiraţie.

Substanţele minerale dizolvate în plasmă sunt în starea ionică, anioni şi cationi, concentraţia cărora în normă este egală.

Sodiul (Na^+), avînd o concentraţie majoră în organism, participă la reglarea presiunii osmotice şi echilibrului acido-bazic. Între concentraţia intra- şi extracelulară a ionului Na^+ există un echilibru, ce se realizează printr-un mecanism de transport activ la nivelul membranelor celulare, aşa-numita pompă de electroliţi.

Potasiul (K^+) – cationul spaţiilor intracelulare. În celulă K^+ este legat de proteină, de glicogen, de resturi de fosfat. Hipopotasiemia poate duce la paralizia muşchilor intestinali, a membrelor şi a muşchiului cardiac.

Calciul (Ca^{2+}) se întîlneşte în organism în trei forme:

– ionizat sau difuzabil – singura formă funcţional activă;

– neionizat – reprezintă complecşi solubili şi difuzabili (citratul, chelaţii, etc.);

– calciu nedifuzabil, legat de proteină (în special de albumine).

Calciul are un rol plastic (intră în componenţa oaselor) şi un rol dinamic (sub formă de ioni de Ca^{2+} participă la numeroase mecanisme vitale).

Magneziul (Mg^{2+}) este un macroelement al organismului. Funcţiile sale principale sunt:

– participă la procesul de creştere;

– activator în procesele ce necesită ATP;

– asigură permeabilitatea celulară;

– joacă un rol important în structura şi funcţiile mitocondriilor şi ribozomilor.

Din grupul oligoelementelor mai fac parte fierul, cuprul, nichelul, cobaltul ş. a.

Fierul se găseşte în organism sub diferite forme: legat de porfirină, depozitat sub formă de feritină, transferină şi fier feric. El îndeplineşte rol structural (hemoglobina, mioglobina, hemenzimele) şi dinamic, funcţional (schimburile energetice ale metabolismului celular).

Din anioni cei mai răspîndiţi sunt fosforul, clorul, carbonatul.

Fosforul este prezent sub formă de:

– acid fosforic sau sărurile lui;

– monoesteri ai acidului fosforic;

– esteri ai acizilor organici;
– polimeri ai acidului metafosforic.

Rolul fosforului în organism este variat:

– structural;
– funcţional – prin participarea la metabolismul intermediar al glucidelor, lipidelor, proteinelor;
– energetic (ATP, fosfocreatina);
– component al coezimelor (NAD^+, TPP, PAP etc.).

Clorul (Cl^-):

– reglează presiunea osmotică;
– sub formă de HCl asigură pH-ul pentru activitatea peptidazelor gastrice.

Absorbţia clorului se realizează în tractul degestiv printr-un mecanism de schimb cu ionul bicarbonat. În organism se conţine sub formă de clorură de sodiu.

Experienţa 1. ***Determinarea ionilor de clor în lichidele biologice (ser, urină) prin titrare mercurimetrică în prezenţa difenilcarbazonului ca indicator.***

Principiul metodei. Ionii de clor se titrează cu nitratul de mercur în punctul echivalent. Excesul de nitrat formează cu difenilcarbazonul un complex de culoare albastră-liliachie.

Mod de lucru. Într-un pahar mic sau o eprubetă se iau cu pipeta 1,8 ml de apă distilată, se adaugă 0,2 ml lichid biologic cercetat şi 4 picături soluţie de difenilcarbazon. Amestecul se titrează cu nitrat de mercur din microbiuretă pînă la apariţia coloraţiei albastre-liliachii.

Pentru standardizarea soluţiei de nitrat de mercur, la 2 ml de soluţie standard de clorură de sodiu de 0,01N se adaugă 4 picături de soluţie de difenilcarbazon şi se titrează ca şi proba de cercetat.

Calculul se face după formula:

$$C = \frac{0,02 \times A \times 5000}{B} \text{ mM/l}, \quad \text{unde:}$$

0,02 – numărul de mM de clor în ml soluţie standard de clorură de sodiu;

A – cantitatea de nitrat de mercur, în ml, consumată la titrarea probei de cercetat;

B – cantitatea de nitrat de mercur, în ml, consumată la titrarea soluţiei standard de clorură de sodiu;

5000 – recalculare la un litru de lichid biologic.

Valori normale: serul sanguin - 96-108 mM/l sau 340-390 mg/100 ml; urina – 170-210 mM/l sau 600-740mg/100 ml.

Valoarea diagnostică. Hipercloremia se întîlneşte în deshidratare (care nu e legată de diaree sau vărsătură), afecţiuni ale rinichilor, decompensare a inimii, în administrarea unei cantităţi mari de cloruri cu alimentele. Hipocloremia se întîlneşte în diaree, vărsătură, stenoză pilorică, unele boli infecţioase şi alte stări patologice.

Experienţa 2. ***Dozarea calciului în serul sanguin*** *(prin reacţia de culoare cu murexid în prezenţa glicerolului).*

Principiul metodei. Murexidul cu calciul în mediu alcalin formează un complex colorat, stabilitatea căruia se măreşte în prezenţa glicerolului.

Mod de lucru. În eprubetă se iau 0,3 ml apă, 0,1 ml ser şi 3 ml reactiv murexid-glicerol. Conţinutul eprubetei se agită şi peste 5 min se fotometrează la FEC (cuva – 1cm, filtrul de lumină verde), faţă de proba de control care spre deosebire de cea experimentală, nu conţine ser (în fiecare grupă se vor efectua 1-2 probe de control).

Calculul se face după curba etalon.

Prepararea reactivului murexidgliceric 20 mg de murexid se dizolvă în 10 ml soluţie de KOH (4 N). La 1 ml de soluţie căpătată se adaugă 10 ml apă distilată şi 10 ml de glicerol. Conţinutul eprubetei se agită.

b) Biochimia biogenezei urinei. Componentele patologice ale urinei.

Rinichiul este un organ cu important rol homeostatic. El menţine constantă compoziţia şi volumul lichidului extracelular. Funcţia principală a rinichilor este producerea urinei prin care se reglează tranzitul hidric, se elimină produsele finale ale metabolismului, substanţele în exces şi cele străine ca atare sau produsele lor detoxificate.

Funcţia homostatică a rinichiului se realizează prin următoarele căi:

a) reglarea volumului şi osmolarităţii fluidelor organice prin procesele selective de resorbţie sau secreţie a ionilor şi apei;

b) reglarea echilibrului acido-bazic în cooperare cu plămînii şi cu diferite sisteme tampon din spaţiul extracelular;

c) eliminarea produselor finale solubile şi insolubile ale metabolismului (uree, aminoacizi liberi, acid uric, creatină, creatinină, bilirubină conjugată, electroliti etc.), precum şi a substanţelor străine metabolizate în organism;

d) participarea la unele procese metabolice de biosinteză şi reglare: biosinteza, reglarea şi secreţia unor hormoni aşa ca renina, eritropoietina, hidroxilarea vitaminei D şi formarea formei active (1,25-dihidroxi-calciferolul).

Formarea urinei se realizează în trei etape: filtrare glomerulară, resorbţie tubulară şi secreţie tubulară. Lezarea structurii anatomice a rinichilor în diferite maladii provoacă şi modificarea funcţiei lor.

Cunoaşterea compoziţiei chimice a urinei are o importanţă deosebită în diagnosticarea tulburărilor diferitelor organe şi procese metabolice, precum şi a rinichilor.

Datele calitative pe care le pune la dispoziţie analiza urinei, alături de datele clinice pe care le obţinem printr-un examen al bolnavului, asigură stabilirea unui diagnostic corect al unei maladii renale sau a unor maladii ce afectează alte organe.

Prin vasele renale timp de 24 ore trec cca 1000 l de sînge şi se filtrează 180 l de *urină primară*. Dar numai aproximativ 1 % din ea se transformă în urină, cealaltă parte, împreună cu substanţele dizolvate în ea, se reabsorb în tubii proximali ai rinichiului. Timp de 24 ore se formează în medie la femei 1200 ml, iar la barbaţi 1500 ml de urină secundară.

În urina diurnă se conţin în medie 40 g de substanţe organice şi 20 g de substanţe anorganice. La analiza urinei trebuie cercetate proprietăţile ei fizico-chimice: densitatea, culoarea, transparenţa, mirosul, cantitatea (diureza), componentele organice şi anorganice.

Cantitatea de urină eliminată poate fi mai mică (oliguria), sau mai mare decît valorile normale (poliuria); poate avea loc şi anuria – încetarea definitivă a eliminării de urină.

Culoarea urinei normale, de obicei, este galbenă cu diferite nuanţe – de la galben-palid pană la galben-rosu. Aceasta depinde de conţinutul în urină al unor pigmenţi, în special, urocromul (de culoare roşie palidă). La folosirea în alimentaţie a unor legume (sfeclă roşie), administrarea unor medicamente (amidopirină, antipirină) culoarea urinei este roză-roşiatică. Daca în urină se conţin pigmenţi sanguini, ea se colorează în roz sau brun; în prezenţa

pigmenţilor biliari – verde sau galbenă-brună; culoarea neagră – în alcaptonurie (determinată de prezenţa pigmenţilor, derivaţi ai acidului homogentizinic).

Prezenţa în urină a sîngelui, puroiului, proteinelor condiţionează apariţia unei opalescente şi tulbureli şi indică procese patologice în rinichi şi căile urinare.

Experienta 1. ***Măsurarea densităţii urinei.***

Principiul metodei. În normă, densitatea urinei măsurată la temperatura de 15°C variază în limitele 1,010– 1,025. Densitatea depinde de cantitatea de substanţe dizolvate cu cantitatea de urină eliminată (corelaţie invers proporţională). Această corelaţie dintre densitatea şi cantitatea de urină nu se observă în diabetul zaharat, cînd şi cantitatea, şi densitatea sunt mărite. Densitatea urinei se modifică în diferite patologii; în diabetul nezaharat se observă scăderea bruscă a ei.

Densitatea urinei se determină cu ajutorul areometrelor speciale – urometrelor. Se cunosc două tipuri de urometre: pentru urină de densitate mică şi normală (cu gradaţii 1,000 – 1,030) şi pentru urină de densitate mare (cu gradaţii 1,030 – 1,060).

Mod de lucru. Într-un cilindru suficient de larg, pentru a asigura plongarea urometrului, se toarnă urina astfel încît să nu se facă spumă. Dacă ea totuşi s-a format, se înlătură cu ajutorul hârtiei de filtru. În cilindru se introduce urometrul şi după cîteva basculări se citeşte indicaţia lui. Citirea se face pe linia scării urometrului care corespunde meniscului de jos al lichidului. Citirea nu trebuie să se facă atunci, cînd urometrul este lipit de pereţii interiori ai cilindrului.

Experienţa 2. ***Determinarea acidităţii (pH-ului) urinei.***

Aciditatea urinei este determinată de substanţele cu caracter acid (în special fosfatul monosodic NaH_2PO_4), disociate complet în urină. Pentru determinarea acidităţii urinei se foloseşte metoda colorimetrică.

Mod de lucru. În mijlocul fişiei de hîrtie indicator Rifan se aplică 1-2 picături de urină cercetată. Comparînd culoarea hîrtiei cu scara de culori etalon se determină valorile pH-ului urinei.

Experiența 3. ***Determinarea unor componenți normali și patologici ai urinei prin metoda expres cu benzi-test.***

Cu ajutorul benzilor-test combinate (îmbibate cu indicatori și reactivi) este posibilă determinarea în urină a șase indici importanți: pH-ul, concentrația de proteine, glucoză, corpi cetonici, urobilinogen și sînge.

Mod de lucru. Se folosește urina centrifugată și bine amestecată. Toată fișia-test se introduce în vasul cu urină timp de o secundă. Excesul de urină se înlătură de pe fișie, aplicînd-o de pereții vasului. După 30-60 secunde culorile care apar se compară cu scara etalon. Culorile apărute numai la marginile benzii sau peste 2 minute nu prezintă importanță diagnostică. Cu benzile-test se examinează urina proaspătă sau păstrată nu mai mult de 4 ore la temperatura camerei.

Proteinele. În caz de proteinurie are loc modificarea culorii benzii-test de la galben la verde (0,3, 1,0, 5,0 g/l); proteinuria este considerată patologică dacă conținutul de proteină este mai mare de 0,25 g/l.

Glucoza. În caz de reacție pozitivă, culoarea se modifică de la oranj la brun după 60 secunde (5,55, 16, 65, 55, r5 mM/l). Culoarea se modifică și la o concentrație mică de glucoză (2,2 mM/l).

Corpii cetonici. În caz de reacție pozitivă, culoarea se modifică de la roză spre violetă (+, + +, + + +). Sensibilitatea benzii-test față de acidul acetilacetic este mai mare decît față de acetonă, iar la acidul β-hidroxibutiric în general nu reacționează.

Limitele de sensibilitate: pentru acidul acetilacetic – 100 mg/l, pentru acetonă mai sus de 400 mg/l.

Urobilinogenul. În caz de reacție pozitivă, culoarea se modifică de la roză spre roșie (limita de sensibilitate este de 4 mg/l).

Sîngele. Pentru eritrocite și hemoglobină se folosește o scară specială de comparare. Eritrocitele libere se evidențiază sub formă de puncte separate sau aglomerații de culoare verde pe fond galben (5-10, 50, 250 eritrocite/μl). Culoarea verde uniformă indică hemoglobina liberă sau eritrocitele hemolizate, sau mioglobina (50-200 eritrocite/μl). În caz de conținut redus de sînge în urină sau cînd benzile sunt mai mult timp ținute în urină, reacția poate să apară deja după 1-2 minute.

Sursa de erori. Rezultate greșite pot fi obținute în caz cînd bolnavul

primeşte cantităţi mari de vitamină C, unele medicamente cu proprietăţi oxidoreducătoare.

Experienţa 4. ***Identificarea indicanului.***

Principiul reacţiei. Indicanul se transformă în indoxil după hidroliza prealabilă a legăturii esterice prin acţiunea unui acid mineral puternic şi oxidarea ulterioară a indoxilului cu triclorura de fier cu formarea unui compus colorat.

Mod de lucru. La 4 ml de urină se adaugă 0,4 ml de soluţie de acetat de plumb pentru precipitarea pigmenţilor biliari, sărurilor şi a altor substanţe care împiedică decurgerea reacţiei. Conţinutul se filtrează.

La 1-2 ml de filtrat se adaugă un volum egal de reactiv Obermeyer, 1,0 ml de cloroform; conţinutul se amestecă atent. Dacă stratul de cloroform (de la fundul eprubetei) se colorează în albastru sau roşu, el se aspiră şi se transferă în altă eprubetă în care se adaugă cîteva picături de tiosulfat de sodiu. În caz de reacţie pozitivă, culoarea stratului de cloroform nu dispare la adăugarea tiosulfatului de sodiu. În normă reacţia este negativă. Prezenţa în probă a urotropinei impiedică identificarea indicanului.

Importanţa clinico-diagnostică. Indicanul este sarea de potasiu sau sodiu a acidului indoxilsulfuric. În urina oamenilor sănătoşi este prezentă în cantităţi infime, care nu pot fi identificate cu metode obişnuite. Cantităţi mai mari de indican se conţin în urina animalelor erbivore şi la oameni în caz de putrefacţie intensă a proteinelor în intestin ca urmare a prezenţei unei cantităţi mari de bacterii de putrefacţie – în constipaţie, ocluzie intestinală.

Experienţa 5. ***Identificarea mucopolizaharidelor*** *(glicozaminglicanilor).*

În urina diurnă a omului sănătos se conţin 2,7-7,5 mg de mucopolizaharide (în special condroitinsulfaţii A şi C). În gargoilism şi boala Gunter se observă creşterea eliminării mucopolizaharidelor cu urina (mucopolizahariduria) – pînă la 30-80 mg/24 ore.

Principiul probei Berri-Spinanger. La interacţiunea albastrului de toluidină cu mucopolizaharidele în mediu acid se obţine o culoare roşie (metacromazia).

Mod de lucru. Pe o bandă de hîrtie de filtru, la distanţa de 1 cm se aplică cu micropipeta 0,005, 0,01 şi 0,025 ml de urină. Fîşia se usucă la

temperatura camerei şi după aceasta se introduce în soluţie de albastru de toluidină de 0,04% timp de un minut.

Banda se scoate din soluţie şi se spală în solutie de acid acetic de 10%. Dacă concentraţia de mucopolizaharide în urină este mai mare de 10 mg/dl, pe unele pete de urină se obţine o culoare roşie.

La nou-născuţi, în primele două săptămîni de viaţă, reacţia este negativă; reacţia pozitivă pronunţată este caracteristică pentru gargoilism.

c) Biochimia ficatului

În organismul omului şi al animalelor, ficatul reprezintă unul din cele mai importante organe. În decursul evoluţiei lumii vii, ficatul a dobîndit diferite funcţii biochimice, devenind locul unde se produc majoritatea proceselor metabolice. De aceea el este considerat laboratorul biochimic al organismului animal.

Perturbarea metabolismului atrage după sine modificarea funcţiilor şi a structurilor ficatului şi a organismului în întregime.

La om greutatea ficatului reprezintă în medie 1/40 din masa organismului, ceea ce constituie aproximativ 1500 g.

Funcţiile ficatului:

a) eliberează în mod continuu în sînge substanţe nutritive chiar şi atunci cînd organismul nu primeşte alimente (scindează glicogenul cu eliberare de glucoză, oxidează acizi graşi şi formează corpi cetonici);

b) depozitează surplusul de substanţe hrănitoare şi vitamine;

c) întreţine unitatea contradictorie dintre sinteză şi catabolism;

d) intervine activ în homeostaza mediului intern;

e) sintetizează ureea;

f) secretă bila, necesară digestiei (activării lipazei) şi absorbţiei acizilor graşi. În componenţa bilei sunt eliminate diferite substanţe din organism (bilirubina, colesterolul ş. a.).

g) îndeplineşte funcţia de detoxicare a organismului.

Ficatul participă la:

1. Metabolismul glucidelor - eliberează glucoza în sînge (mobilizarea glicogenului), reduce hiperglicemia (sinteza glicogenului), reglînd astfel nivelul de glucoză; transformă galactoza şi fructoza în glucoză; asigură reacţiile de gluconeogeneză - sinteza de glucoză şi glicogen pe seama unor substanţe neglucidice (acidul lactic, acidul piruvic, aminoacizii glucoformatori).

2. Metabolismul lipidelor. Ficatul este organul principal de sinteză a lipidelor

din glucide, a fosfolipidelor şi lipoproteidelor; corpilor cetonici şi colesterolului din acetil-CoA.

3. Metabolismul proteic. Ficatul reţine o mare parte a aminoacizilor absorbiţi din intestin şi sintetizează proteine specifice după necesităţile organismului. Cele mai importante proteine plasmatice se formează în ficat. Astfel, din ficat trece în plasmă fibrinogenul, protrombina, proaccelerina, proconvertina, fracţiile α- şi β-globulinice şi albuminele. În organismul uman ficatul este sediul celor mai active procese de dezaminare a aminoacizilor. La mamifere ficatul este locul principal al ureogenezei. Amoniacul rezultat prin dezaminare intră în ciclul ornitinic şi se sintetizează ureea.

4. Rolul protector al ficatului prin care se asigură detoxicarea toxinelor endo- şi exogene şi inactivarea hormonilor şi substanţelor biogene. Aceste substanţe în organism sunt supuse unor transformări care duc la formarea de compuşi mai puţin toxici, mai solubili, mult mai difuzibili şi, astfel, mai uşor excretabili. Ficatul pune în funcţie o serie de procese fizico-chimice, cum sunt reacţiile de oxidare, reducere, metilare, acetilare, conjugare ş. a. După S. Ham (1983), în ficat au loc circa 500 de reacţii.

În diferite afecţiuni, însoţite de leziuni ale ficatului, se modifică starea funcţională a acestui organ, spectrul enzimatic şi al metaboliţilor în sînge ceea ce facilitează diagnosticul.

Experienţa 1. ***Determinarea activităţii pseudocolinesterazei în serul sanguin.***

Principiul metodei. Pseudocolinesteraza hidrolizează acetil-colinclorura, formînd acidul acetic şi colina. Acidul acetic modifică pH-ul soluţiei tampon, fapt determinat colorimetric după schimbarea culorii indicatorului.

Mod de lucru. În eprubetă se introduc 5 ml soluţie tampon de veronal, 0,2 ml apă distilată şi 0,1 ml ser. Amestecul se incubează 5 minute la 37°C. Se adaugă 0,2 ml soluţie de prozerină, apoi se măsoară densitatea optică a soluţiei la FEC în cuve de 5 mm, filtrul de lumină verde, faţă de martor. Martorul se prepară ca şi soluţia experimentală, cu excepţia că soluţia de prozerină se adaugă concomitent cu acetilcolinclorura.

Calculul. Din extincţia martorului se scade extincţia experienţei şi după valoarea obţinută, conform curbei de calibrare, se determină activitatea pseudocolinesterazei.

Valorile normale: 160-340 μM/oră ml.

Importanţa clinico-diagnostică. Pseudocolinestraza este o enzimă secretoare hepatică, ce relevă capacitatea biosintetică a hepatocitelor. Activitatea ei se micşorează în toate afecţiunile hepatice, gradul diminuării corelînd cu gradul afectării organismului şi volumul ţesutului deteriorat.

Experienţa 2. ***Determinarea ceruloplasminei în serul sanguin.***

Principiul metodei. Ceruloplasmina oxidează p-fenilendiaminclorura, ceea ce poate fi determinat fotocolorimetric.

Mod de lucru. În două eprubete se introduc cîte 0,1 ml ser, 1 ml p-fenilendiaminclorură şi 2 ml soluţie tampon acetat. În eprubeta martor se introduce imediat 1 ml de azidură de sodiu. Eprubetele se agită şi se incubează 60 minute la 37°C. După incubare, în eprubeta experimentală se adaugă 1 ml de azidură de sodiu. Se agită ambele eprubete şi conţinutul lor se aduce pînă la 10 ml cu soluţie de NaCl de 3%. Probele imediat se colorimetrează, experienţa faţă de martor, în cuve de 10 mm, filtrul de lumină verde.

Calculul: Ccerulop. = E·100 (unităţi convenţionale).

Valorile normale: 24,6-26 UC.

Importanţa clinico-diagnostică. Ceruloplasmina este o proteină hepatospecifică cu funcţii duale: peroxidazică şi transportator de Cu^{2+}. Cantitatea ei este drastic micşorată sau ea lipseşte totalmente, de exemplu în afecţiunea Wilson (ereditară). Cantitatea ceruloplasminei creşte semnificativ în melanom şi schizofrenie.

Teme pentru autopregătire

1. Apa:
- proprietăţile fizico-chimice;
- ionizarea şi produsul ionic al apei;
- rolul apei în organism;
- repartiţia apei în organism;
- necesarul zilnic, pierderile şi excesul de apă;
- apa endogenă;
- patologia: bilanţul pozitiv şi negativ;
- sindroame clinice: poliuria, oligouria, nicturia, anuria.

2. Sărurile (elementele minerale):
- rolul metabolic (generalităţi);

- macroelemente: sodiu, potasiu, calciu, clor, magneziu, fosfor, fier, sulf etc.
- rolul metabolic;
- presiunea osmotică: soluţii izo-, hiper-, hipotonice, ionograma;
- microelemente: cupru, mangan, zinc, cobalt, molibden, seleniu, iod etc.;
- rolul în reacţiile metabolice.

3. Reglarea metabolismului hidro-salin:
- sistemul neurohormonal (vasopresina, aldosteronul);
- sistemul renină-angiotensină.

4. Mecanismul formării urinei. Noţiune despre clearance.

5. Componenţii normali şi patologici ai urinei. Mecanismul formării şi importanţa clinico-diagnostică a identificării şi determinării lor.

6. Rolul ficatului în integrarea metabolismului proteic, glucidic, lipidic.

7. Rolul ficatului în dezintoxicare:
- faza reacţiilor de oxido-reducere: caracteristica, importanţa lanţului microsomial de oxidare;
- faza reacţiilor de conjugare: principalii agenţi şi enzime conjugate, reacţiile.

Întrebări pentru autocontrol şi situaţii de problemă

1. Ce proteine plasmatice se sintetizează integral în ficat – albuminele, α-, β- sau γ - globulinele? Care sunt consecinţele diminuării biosintezei lor?

2. De ce ureogeneza este un proces specific hepatic?

3. Care este legătura nemijlocită dintre ciclul pentozofosfaţilor şi: a) procesele de dezintoxicare hepatică; b) biosinteza lipidelor în ficat?

TEMA 34

Biochimia ţesutului conjunctiv şi osos

Ţesutul conjunctiv este cel mai răspîndit din organism, formînd carcasa de sprijin şi învelişul exterior al corpului. Componenta obligatorie a tuturor ţesuturilor alcătuieşte, împreună cu sîngele, mediul intern al organismului.

Funcţiile ţesutului conjunctiv:

1. De sprijin (oasele, muşchii, tendoanele, pielea, alte sisteme care formează carcasa organismului şi asigură locomoţia).

2. Trofică (vasele asigură trofica).

3. De depozitare (lipide, pigmenţi, apă, etc.)

4. De protecţie (pielea, învelişurile seroase, capsulele - toate sunt bariere împotriva răspîndirii infecţiilor).

5. Reparativă (adaptarea plastică). Acest ţesut păstrează capacitatea de proliferare, astfel completîndu-se defectele apărute (cicatrizarea).

6. De lubrefiere şi amortizare a şocurilor mecanice, asigurînd elasticitatea ţesuturilor şi organelor.

7. Adezivitatea celulară.

8. Influenţează forma, proliferarea, migrarea şi dezvoltarea celulelor în cadrul evoluţiei celulare.

Compoziţia chimică şi structura.

Ţesutul conjunctiv este alcătuit din mai multe componente:

1. Anumite tipuri de celule: fibroblaşti (predomină în fibrele de legătură), condroblaşti (care formează cartilajele), osteoblaşti (care intră în structura oaselor), plasmocite, macrofagi, etc.

2. Matricea extracelulară (intercelulară), reprezentată prin proteine fibrilare incluse într-un gel polizaharidic hidratat. Proteinele şi polizaharidele interacţionează formînd structuri tridimensionale (proteoglicani).

Matricea intercelulară este constituită din fibre, spaţiile dintre care sunt completate cu substanţă bazală, alcătuită din complexe proteoglucidice.

Componenta fibrilară este reprezentată prin fibre de colagen (care predomină) şi elastină, precum şi de alte proteine (fibronectina, laminina, etc.).

Aşadar, matricea intercelulară prezintă două componente:

1. *Componenta proteică*, reprezentată prin fibre de colagen (proteina principală) şi în mai mică masură de elastină.

– Colagenul, cea mai răspîndită proteină din organism, constituie 25-30% din totalitatea proteinelor corpului. Această proteină nu se dizolvă în apă, posedă elasticitate redusă, conferă rezistenţă la tracţiuni, funcţia principală fiind păstrarea integrităţii structurii ţesuturilor. Spre deosebire de alte proteine, în colagen se constată un conţinut mare de glicină, prolină, hidroxiprolină şi hidroxilizină.

Hidroxilizina şi hidroxiprolina formează legături de hidrogen între lanţurile peptidice, stabilizînd astfel molecula.

Hidroxilarea prolinei este catalizată de către o hidroxilază cu participarea vitaninei C. În scorbut se sintetizează un colagen instabil. În consecinţă, paradonţiul şi vasele sangvine devin fragile, apar hemoragii peteşiale, stomatite, ulceraţii cu toate consecinţele acestora.

2. *Componenta glucidică.* Gelul polizaharidic din matricea extracelulară este constituit din glicozaminoglicani (denumirea mai veche mucopolizaharide acide). Glicozaminoglicanii atribuie acestui ţesut maleabilitate, elasticitate şi viscozitate înaltă. Ei se află în complexe cu proteinele, formînd proteoglicani (mucoproteide), al căror conţinut glucidic este de cca 90-95%. Funcţia principală a proteoglicanilor este cea de control a deplasării apei şi a electroliţilor extracelulari.

Caracteristica generală a glicozaminoglicanilor

1. Sunt polianioni care conţin grupe acide şi de aceea fixează cationii (Na^+, K^+, Ca^{++}).
2. Datorită caracterului hidrofil tind să formeze agregate.
3. Reglează permeabilitatea.
4. Asigură elasticitate şi stabilitate faţă de compresii.
5. Interacţionează specific cu colagenul, elastina, fibronectina, laminina şi alte proteine din matrice.
6. Contribuie la turgescenţă.
7. Înlesnesc migrarea celulară.
8. Au rol anticoagulant (heparina).

Natura chimică. Glicozaminoglicanii sunt polimeri liniari alcătuiţi din unităţi dizaharidice repetabile ce conţin o hexozamină (glucozo-sau galactozamină) şi un acid hexuronic (glucuronic, galacturonic, iduronic). În majoritatea cazurilor, toate unităţile dizaharidice conţin gruparea sulfat, legată covalet.

Principalii reprezentanţi: cheratonsulfaţii, acidul hialuronic, condroitin-sulfaţii, dermatansulfatul, heparina, heparansulfatul.

Proteoglicanii (mucoproteide), conţinînd condroitinsulfat, se asociază prin intermediul unor proteine de legătură cu acidul hialuronic formând agregate supramoleculare de dimensiuni foarte mari (cu masa moleculară de ordinul sutelor de milioane).

Colagenozele sunt afecţiuni ale ţesutului conjunctiv caracterizate prin modificări calitative şi cantitative ale colagenului.

Din acest grup de boli fac parte:

1. Lupusul eritematos.
2. Osteoartrita.

3. Artrita reumatismală.

4. Unele afecţiuni ereditare.

În unele colagenoze defectele metabolice sunt elucidate. De exemplu, în poliartrita reumatoidă s-a constatat o activitate anormal de mare a enzimelor proteolitice lizozomale. Ca urmare, proteinele ţesutului conjunctiv (în special colagenul) sunt degradate hidrolitic. Numărul fibrelor de colagen din ţesutul respectiv se reduce şi în locul lor apar infiltrate inflamatorii. În această boală sunt degradate parţial şi macromoleculele de acid hialuronic din lichidul sinovial.

În colagenozele ereditare sunt implicate defecte enzimatice care conduc la fragilitatea şi hiperextensibilitatea unui număr mare de ţesuturi. Printre aceste defecte enzimatice mai frecvente sunt deficienţele de lizin hidroxilază, procolagen-N-peptidază, procolagen-C-peptidază. Asemenea deficienţe enzimatice, împreună cu tulburările metabolismului cuprului, se întîlnesc în sindromul Ehlers-Dantos şi Menkes. Lipsa oricărei enzime necesare sintezei de procolagen şi modificările ce au loc după eliberarea lui din celulă, reprezintă cauze potenţiale pentru apariţia unei boli ereditare.

Colagenozele determinate genetic nu sunt provocate întotdeauna de lipsa enzimelor implicate în metabolismul colagenului. De exemplu, în sindromul Morfan lanţurile α_2 sunt mai lungi şi lipsite de funcţionalitate, ceea ce duce la stabilirea unor legături anormal încrucişate.

În maladia numită *osteogenesis imperfecta* se constată o dezorganizare totală a ţesutului conjuctiv din tendoane, ligamente, aparatul digestiv, schelet şi scleră. În cazul acestei afecţiuni, în fibroblaşti se sintetizează un colagen anormal ale cărui molecule cuprind trei lanţuri polipeptidice identice de tip α. Aceste lanţuri polipeptidice înlocuiesc colagenul normal, constituit dintr-un lanţ de tip α_1 şi două lanţuri de tip α_2. Această diferenţă structurală are multiple repercusiuni defavorabile care se manifestă la nivelul organelor menţionate: sclera este albastră, auzul redus, oasele se deformează şi se fracturează uşor etc.

Există, de esemenea, *modificări calitative dobîndite* însoţite de schimbări calitative ale componentelor ţesutului conjuctiv. De exemplu, în scorbut, diabet zaharat, hiperparatiroidism etc., au loc de asemenea modificări în biosinteza şi degradarea componentelor ţesutului conjuctiv (colagen, elastină, proteoglicani).

În scorbut are loc un deficit de prolilhidroxilază din cauza insuficienţei vitaminei C care o activează. Ca urmare, prolina nu se hidroxilează în hidroxiprolină, lizina în hidroxilizină şi astfel întreaga structură a colagenului se alterează (se formează un colagen instabil, flax); paradonţiul este instabil şi de aceea dinţii cad, iar mucoasa cavităţii bucale prezintă ulceraţii. Din cauza deteriorării membranei bazale, capilarele devin permeabile, fragile, apar hemoragii peteşiale pe piele şi organe, uneori hemoragiile sunt masive.

În caz de diabet zaharat se remarcă o îngroşare a ţesutului conjuctiv din pereţii vaselor sangvine ale retinei şi ale altor ţesuturi. Aceste modificări pot conduce la scăderea vederii şi chiar la orbire.

Unele tulburări renale pot fi atribuite îngroşării ţesutului conjuctiv la nivelul glomerulului.

Mucopolizaharidozele. Din acest grup fac parte afecţiunile determinate de defecte genetice ale enzimelor ce scindează componenta glucidică a ţesutului conjunctiv. Aceste defecte sunt însoţite de depozitarea în cantităţi mari în ţesuturi şi organe a glicozaminoglicanilor şi excreţia excesivă a lor cu urina.

Acumularea acestor substanţe în diferite ţesuturi antrenează multiple şi variate modificări tisulare: schimbări în structura scheletului, întîrzieri în dezvoltarea organelor, acuitate auditivă scăzută sau chiar surditate, retard mintal, tulburări cardio-pulmonare, hepatosplenomegalie, cataractă, atrofia nervului optic, reducerea tonusului muscular etc.

Dereglările descrise pot fi mai mult sau mai puţin pronunţate, în dependenţă de tipul afecţiunii.

În urină este majorată excreţia dermatan- şi keratansulfaţilor, a condroitinsulfatului, cifrele atingînd valori de 100-200 mg în 24 de ore, în loc de cca 15 mg, ca la persoanele sănătoase.

Actualmente sunt descrise 7 tipuri clinico-biochimice de mucopolizaharidoze, în dependenţă de enzima deficitară şi de acumularea glicozaminoglicanilor în ţesutul conjunctiv.

Ţesutul osos prezintă una din varietăţile ţesutului conjunctiv cu componenţă chimică complexă şi proprietăţi mecanice caracteristice (rezistenţă mecanică mare şi elasticitate redusă).

În afară de elemente celulare (osteoblaste, osteoclaste etc.) în ţesutul osos se disting trei componente structurale: componenta minerală

predominantă (constituie 70% din greutatea osului; matricea organică – cca 20% şi apa – 2–10%).

Componenţii minerali (95%) sunt reprezentaţi de calciu, fosfaţi şi carbonaţi (fosfatul tricalcic, carbonatul de calciu) care sunt asociaţi în apatite microcristaline cu formula $[Ca(Ca_3(PO_4)_2)_2]^{2+}2X$ în care "X" reprezintă anioni (CO_3^-, HO^-, F^-), cînd "X" este HO^- combinaţia se numeşte hidroxiapatită $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$.

Substanţa minerală a osului se modifică în tot cursul vieţii.

Substanţele organice alcătuiesc matricea osului, numită osteoid, reprezentată în principal prin colagen aflat sub formă de fibre rezultate din agregarea fibrilelor cu structură periodică.

În afară de colagen, în osteoid au fost identificate şi alte proteine printre care şi osteocalcina, bogată în acid carboxiglutamic, proteina osoasă morfogenetică cu capacitate de a induce diferenţierea în cartilaj a celulelor ţesutului conjunctiv din măduva osoasă, etc.

Matricea organică a osului mai conţine proteoglicani (cca 4%), care includ glicozaminoglicani prezenţi şi în ţesutul conjunctiv. Proteoglicanii înconjoară fibrele de colagen stabilind legături ionice cu acestea, iar pe complexul astfel format sunt ancorate cristale constituite din substanţa minerală.

Procolagenul solubil, cît şi proteoglicanii matricei osoase, sunt sintetizaţi de către osteoblaste. Aceste celule mai conţin glicogen şi enzimele de degradare a acestuia, fosfataza alcalină şi ARN, participant la sinteza proteinelor.

Osteoclastele conţin enzime, în special pe cele cu activitate proteolitică intensă (contribuie la resorbţia osului).

Datorită funcţiilor opuse ale acestor două tipuri de celule (osteoblaste şi osteoclaste), osul se află într-o permanentă distrugere şi refacere, adică într-o reînnoire permanentă.

Mineralizarea osului presupune desfăşurarea simultană a creşterii concentraţiei ionilor fosfatici (HPO_4^{2-}) şi de calciu (Ca^{2+}), precum şi realizarea unui pH bazic. Procesul are loc în regiuni speciale, situate între fibrele de colagen, numite centre de cristalizare. Factorul determinant este aranjarea reciprocă a moleculelor de tropocolagen învecinate în aşa mod că fiecare moleculă este deplasată de cea alăturată cu un sfert din lungimea ei, fapt ce îi conferă fibrei un aspect striat.

În asemenea zone proteoglicanii degradează, eliberînd Ca^{2+}, osteoblastele elimină fosfataza alcalină, care va scinda esterii fosforici (de exemplu glicerofosfatul), sporind astfel concentrația fosfatului. Ionii HPO_4^{2-} și Ca^{2+} sunt fixați pe matricea osului, ulterior ei interacționează cu formarea de $CaHPO_4$.

În mediul alcalin (alcalinizarea mediului se datorează hormonilor steroizi care inhibă glicoliza și deci reduc conținutul piruvatului și lactatului), fosfatul monoacid de calciu trece în fosfat neutru tricalcic – $Ca_3(PO_4)_2$, care prin înglobare de alți ioni formează cristale de hidroxil apatită. Crescînd, cristalele dislocuiesc proteoglicanii și apa. Osul mineralizat practic este lipsit de apă.

Formarea și dislocarea osului sunt asigurate de diferite mecanisme reglatorii:
– parathormonul (acțiune osteolitică);
– tiroxina (favorizează osificarea epifizelor oaselor lungi);
– calcitonina (intensifică fixarea calciului în oase);
– somatotropina (favorizează biosinteza colagenului și a proteoglicanilor; sporește osificarea);
– estrogenii (intervin favorabil în formarea oaselor lungi).

Evident, că hiper- sau hiposecreția oricăruia din acești hormoni va antrena tulburarea proceselor de formare sau dislocare osoasă.

La reglarea metabolismului țesutului osos contribuie de asemenea diferite vitamine: D, A, K, C.

Experiența 1. ***Determinarea conținutului total de prolină și hidroxiprolină în urină.***

Principiul metodei. Prolina este oxidată în oxiprolină cu peroxidul de plumb. Oxiprolina formată, condensîndu-se cu p-dimetilaminobenzaldehida formează un produs de culoare portocalie. Intensitatea culorii este direct proporțională cu cantitatea sumară de prolină și hidroxiprolină.

Mod de lucru. În eprubetă se iau 2,5 ml urină (în care prolina a fost oxidată în oxiprolină), 2,5 ml apă, 0,5 ml soluție p-dimetilbenzaldehidă de 5% și 1 ml soluție de HCl de 2N.

Eprubeta se încălzește în baia clocotindă timp de 1 minut, apoi se răcește și peste 5-10 minute se măsoară densitatea optică a probei de cercetat la FEC (filtrul de lumină verde, cuva – 10 mm) față de control, care se efectuează

identic ca proba de experiență, numai că în loc de urină în eprubetă se introduce apă.

Notă. În fiecare grupă se vor efectua 1-2 probe de control.

Calculul se efectuează după curba etalon.

Importanța clinico-diagnostică. Conținutul prolinei și hidroxiprolinei crește în reumatism, pneumonii, fracturi, procese distructive etc.

Experiența 2. ***Determinarea activității fosfatazei alcaline.***

Principiul metodei. Sub influența fosfatazei alcaline, β-glicerofosfatul scindează fosfatul anorganic a cărui cantitate este direct proporțională cu activitatea enzimei. Cantitatea fosforului este determinată colorimetric cu ajutorul molibdatului de amoniu în prezența acidului ascorbic. Produsul reacției (albastru de molibden) colorează soluția în albastru. Intensitatea culorii este direct proporțională cu cantitatea fosfatului, și deci cu activitatea enzimei.

Mod de lucru. În două eprubete (de experiență și de control) se introduc cîte 0,1 ml ser sanguin (sau salivă) și cîte 1 ml soluție de β-glicerofosfat (pH = 9,0). În eprubeta de control suplimentar se mai introduc 0,9 ml soluție de acid tricloracetic de 10%. Ambele eprubete se introduc în baia de apă pe o oră (37°C). Apoi în eprubeta de experiență se introduc 0,8 ml soluție de acid tricloracetic de 10%. Conținutul eprubetelor se filtrează în alte două cilindre sau eprubete cu volumul de 10 ml (respectiv de control și de experiență). Precipitatul rămas pe filtru se spală cu 1 ml apă; volumul soluțiilor din eprubete se completează cu apă pînă la 5 ml și apoi se determină conținutul fosfatului anorganic în proba de experiență și cea de control. Pentru aceasta, în fiecare eprubetă se introduc cîte 1 ml reactiv molibdenic și cîte 0,5 ml soluție de acid ascorbic de 0,5%. Volumul ambelor eprubete se completează cu apă pînă la 10 ml.

Peste 5 minute se măsoară densitatea optică a probelor față de apă (cuva de 10 mm, filtrul de lumină roșie).

Calculul se efectuează după curba etalon. Diferența dintre conținutul fosforului în proba de experiență și cea de control exprimă activitatea enzimei (în mg/100 ml ser sau salivă).

Valorile normale: 2-4 mg % (la vîrstnici) și 5-15 (la copii).

Importanța clinică. Activitatea fosfatazei alcaline este crescută în rahitism, afecțiuni hepatice, colestază, ciroză hepatică.

Experienţa 3. ***Determinarea activităţii fosfatazei acide.***

Principiul metodei şi modul de lucru sunt identice cu cele ale fosfatazei alcaline cu excepţia că pentru determinarea fosfatazei acide se foloseşte soluţie de β-glicerofosfat cu pH = 4,8.

Fosfataza acidă se conţine în diferite ograne şi ţesuturi (rinichi, oase, ficat, celulele sîngelui, prostată). Deosebit de bogat în această enzimă este ţesutul prostatei, unde activitatea este de 100 ori mai mare decît în alte ţesuturi. *Activitatea fracţiei prostatice a acestei enzime este specific inhibată de tartrat, ionii de fluor şi fier.*

Importanţa clinică. Determinarea activităţii fosfatazei acide se efectuează în scop de diagnostic a carcinomului prostatei, precum şi în cazul metastazelor acestuia în oase. În afecţiunile ţesutului osos (osteodistrofii), este sporită activitatea fosfatazei alcaline, iar în cazul metastazelor carcinomului prostatei în oase sporeşte activitatea ambelor enzime.

Experienţa 4. ***Determinarea activităţii fosfatazei alcaline*** (*metoda cu dinitrofenilfosfat*).

Principiul metodei. Fosfataza alcalină scindează 4-dinitrofenolfosfatul cu formare de 4-dinitrofenol şi fosfat. Activitatea enzimei este exprimată prin cantitatea 4-dinitrofenolului eliberat, determinată colorimetric.

Determinarea se efectuează după tabelul de mai jos:

Reactivii (în ml)	Proba de experienţă A_1	Soluţia de control A_2	Etalonul A_3	Soluţia de control A_4
Soluţie tampon	1,00	1,00	1,00	1,00
Ser	0,02	-	-	-
Reactivul 3	-	-	0,02	-
Apă	-	-	-	0,02

Eprubetele se agită, se pun la incubare (5 minute la 37°C), apoi în fiecare eprubetă se introduc cîte 0,3 ml de substrat şi din nou se pun la incubare pe 10 minute (30°C).

Soluţie inhibitor (ml)	0,50	0,50	0,50	0,50
Ser (ml)	-	0,20	-	-

Eprubetele se agită şi peste 30 de minute se măsoară densitatea optică a probei de experienţă (A_1) şi a soluţiei de control (A_2) faţă de apă, calculînd diferenţa (A_1-A_2). Apoi se măsoară densitatea optică a etalonului (A_3) şi a soluţiei de control (A_4). Se calculează diferenţa (A_3-A_4).

Calibrarea. Se calculează factorul de calibrare (F_2) pentru fotometrul respectiv (cuva – 0,5 cm, filtrul de lumină violetă).

$F_2 = 4/(A_3-A_4)$

Calculul activităţii enzimatice se efectuează conform ecuaţiei:

$F_2 \pm (A_1-A_2)$

Valorile normale:

la bărbaţi – 0,63-1,60 mcat/l la 30°C; 0,90-2,29 mcat/l la 37°C;

la femei – 0,52 – 1,47 mcat/l la 30°C; 0,47-2,10 mcat/l la 37°C.

Experienţa 5. ***Identificarea mucopolizaharidelor*** *(glicozaminoglicanilor)* ***în urină.***

În urina diurnă a omului sănătos se conţin 2,7-7,5 mg de mucopolizaharide (în special condroitinsulfaţii A şi C). În gargoilism şi boala Gunder se observă creşterea eliminării mucopolizaharidelor cu urina (mucopolizaharida) – pînă la 30-80 mg/24 ore.

Principiul probei Berri-Spinanger. La interacţiunea albastrului de toluidină cu mucopolizaharidele în mediu acid se obţine o culoare roşie (metacromazia).

Mod de lucru. Pe o bandă de hîrtie de filtru la distanţa de 1 cm cu micropipeta se aplică 0,005, 0,01 şi 0,025 ml urină, fişia se usucă la temperatura camerei după care se introduce în soluţie de albastru de toluidină 0,04% timp de un minut.

Banda se scoate din soluţie şi se spală în soluţie de acid acetic de 10%. Dacă concentraţia de mucopolizaharide în urină este mai mare de 10 mg/dl, pe unele pete de urină se obţine o culoare roşie.

La nou-născuţi pînă la vîrsta de 2 săptămîni reacţia este negativă. Reacţia pozitivă accentuată este caracteristică pentru gargoilism.

Experienţa 6. ***Determinarea acizilor sialici în serul sanguin după reacţia cu reactivul acetat-sulfuric*** *(reacţia Gess).*

Principiul metodei. La adăugarea la serul sanguin a acidului tricloracetic şi încălzire are loc o hidroliză fină a glicoproteidelor însoţită de scindarea

acizilor sialici (acidul neuraminic şi derivaţii lui acetilaţi), care la încălzire în prezenţa reactivului acetat-sulfuric dau compuşi coloraţi.

Mod de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se introduce 1 ml ser şi agitînd atent eprubeta se adaugă 1 ml soluţie de acid tricloracetic de 10%. Eprubeta se introduce în baia de apă în clocot exact pe 5 minute. Se agită pentru a desprinde precipitatul de pereţii eprubetei şi se centrifughează 5 minute la 1000-1200 rotaţii/minut.

La 0,4 ml de centrifugat se adaugă 5 ml de reactiv acetat-sulfuric şi exact pe 30 minute din nou se introduce în baia de apă clocotindă. Apare o coloraţie roşie-violetă sau brun-roză. Lichidul se răceşte într-un curent de apă de robinet şi se colorimetrează la FEC (filtrul de lumină verde, cuva de 1 cm) faţă de control. Reactivul acetat-sulfuric serveşte drept control.

Calculul se face după curba etalon.

Valorile normale. Concentraţia acizilor sialici în serul sanguin în unităţi "SI" este 620-730 mg/l de acid acetilneuraminic.

Importanţa clinico-diagnostică. Acizii sialici se scindează uşor din moleculele glicoproteidelor prin acţiunea enzimelor microbiene şi celulelor, care se distrug.

Conţinutul de acizi sialici este mărit în maladii infecţioase, boli însoţite de modificări distructive, cînd are loc tulburarea metabolismului tisular însoţit de depolimerizarea şi scindarea glicoproteidelor (tuberculoză, infarct miocardic, colagenoze, maladii canceroase ş.a.). Conţinutul redus de acizi sialici se observă în anemia pernicioasă şi alte stări patologice.

Teme pentru autopregătire

I. Ţesutul conjunctiv (noţiuni generale):
- funcţiile;
- componenţa chimică: compuşii proteici şi glucidici;
- biosinteza şi degradarea colagenului;
- proteoglicanii, biosinteza şi degradarea lor;
- patochimia ţesutului conjunctiv: colagenozele şi mucopolizaharidele (afecţiune de depozitare), perspective de diagnostic şi tratament.

II. Ţesutul osos:
- componenţa chimică: compuşii organici şi minerali;

- particularitățile structurale ale țesutului osos;
- formarea osului;
- reglarea mineralizării: factorii care influențează metabolismul țesutului osos (vitaminele D, C, parathormonul, calcitonina).

Întrebări pentru autocontrol și situații de problemă

1. În laborator a fost prezentată o proteină în scopul identificării acesteia. Prin analiza cromatografică s-a stabilit componența aminoacidică a acesteia:

A) glicina – cca 30%;

B) prolina și hidroxiprolina – 25%;

C) alanina – 10%;

D) tirozina, triptofanul și tioaminoacizii – conținut redus.

Concluzie: proteina prezentată este...

2. La un pacient adult s-au constatat următoarele modificări:

A) în 24 ore cu urina se excretă 200 mg hidroxiprolină;

B) conținutul fosfatului în sînge este redus;

C) conținutul calciului în sînge este mărit;

D) osteoporoză.

Concluzie: asemenea modificări pot fi întîlnite în...

3. Clinic la pacient s-au constatat:

A) sclera de culoare albastră;

B) auzul redus;

C) oasele deformate, fragile.

Analiza colagenului din tendoane, ligamente etc. a arătat, că molecula acestui colagen este constituită din trei lanțuri polipeptidice identice de tip α. De ce afecțiune suferă pacientul?

4. Clinic la pacient s-au constatat:

A) cataractă;

B) dereglări cardio-pulmonare;

C) pierderea auzului;

D) întîrzierea în dezvoltarea mintală;

E) cu urina se excretă cantități considerabile de dermatan- și heparan-sulfat.

Ce presupuneri pot fi făcute referitor la afecțiunea de care suferă pacientul?

5. Clinic la pacient s-au constatat:
A) modificări scheletice marcate;
B) întîrziere mintală absentă;
C) îngroşarea aortei;
D) hepatosplenomegalie moderată;
E) afectarea uşoară a auzului;
F) opacitatea întîrziată a corneei;
G) cu urina se excretă cantităţi considerabile de keratansulfat.
De ce afecţiune suferă pacientul?

RĂSPUNSURI LA ÎNTREBĂRI

CAPITOLUL I

Structura şi funcţiile proteinelor. Enzimele

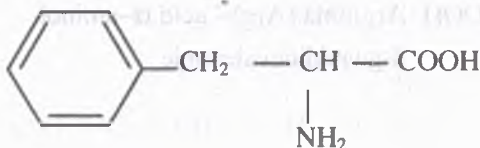
TEMA 1

Introducere. Importanţa biochimiei pentru medicină. Aminoacizii. Reacţiile de culoare ale aminoacizilor şi proteinelor

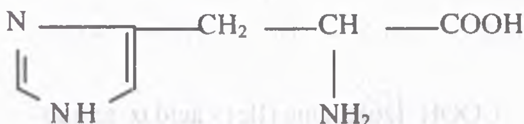




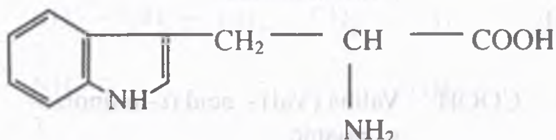
Alanina (Ala) – acid α - aminopropionic



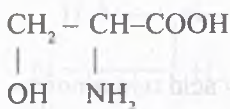
Fenilalanină (Phe) – acid α–amino– β -fenilpropionic



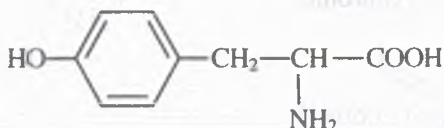
Histidina (His) – acid α–amino– β-imidazolilpropionic



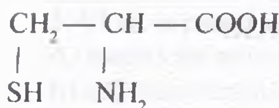
Triptofan (Trp) – acid α–amino– β-indolilpropionic



Serina (Ser) – acid α–amino– β-hidroxipropionic

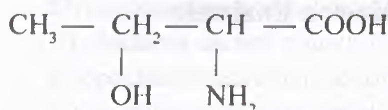


Tirozina (Tyr) – acid p-hidroxifenilalanină

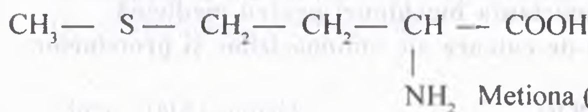


Cisteina (Cys) – acid α–amino–β-tiopropionic

b)

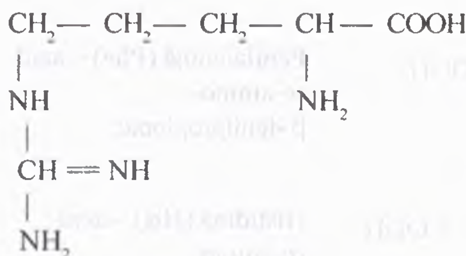


Treonina (Thr) – acid α–amino–β-hidroxibutiric

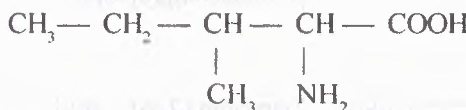


Metiona (Met) – acid α–amino–S-metiltiobutiric

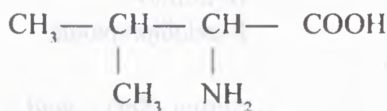
c)



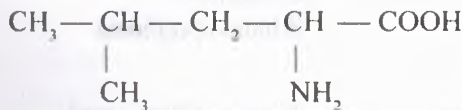
Arginina (Arg) - acid α–amino–β-guanidinovalerianic



Izoleucina (Ile) - acid α–amino–β-metilvalerianic

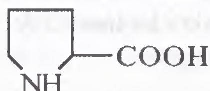


Valina (Val) - acid α–aminoizo-valerianic



Leucina (Leu) - acid α–aminoizo-capronic

2. a) alanină, valină, leucină, izoleucină, fenilalanină, triptofan, metionină şi prolină

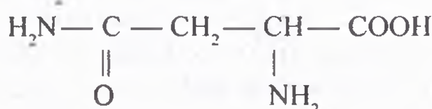


Prolina (Pro)

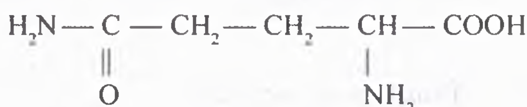
b) serină, treonină, tirozină, cisteină, asparagină, glutamină şi glicocol.




Glicocol (Gly)

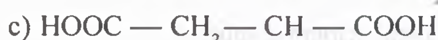


Asparagină (Asn)

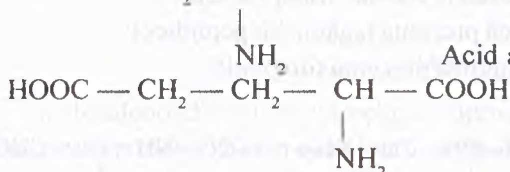


Glutamină (Gln)

c)

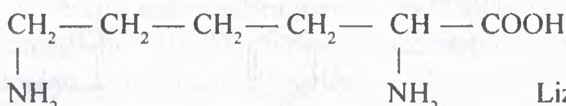


Acid aspartic (Asp)



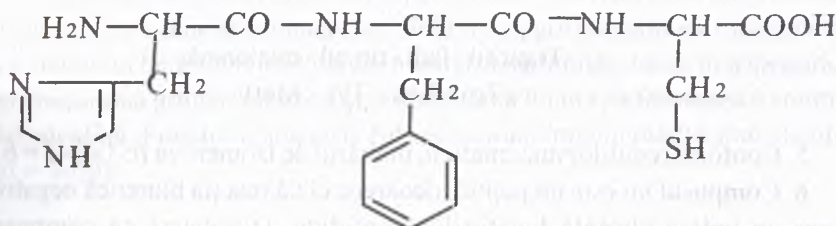
Acid glutamic (Glu)

d) Histidină, arginină şi lizină:



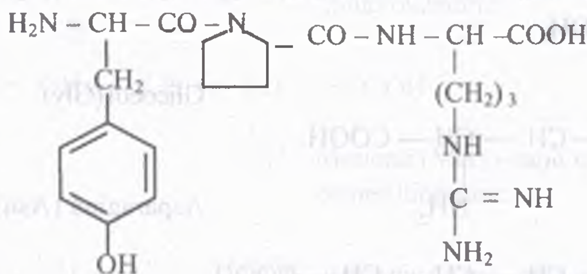
Lizină (Lys)

3.



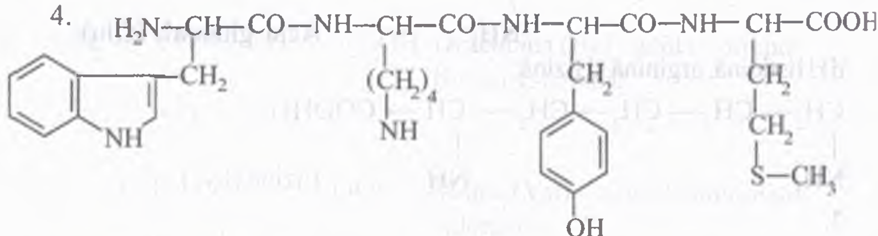
Histidil - fenilalanil - cisteină

Acest tripeptid va da următoarele reacţii de culoare:
1. Reacţia biuretului (prezenţa legăturilor peptidice -NH-CO-);
2. Reacţia cu ninhidrina (prezenţa resturilor de α - aminoacizi);
3. Reacţia xantoproteică (prezenţa fenilalaninei);
4. Reacţia Fol (prezenţa cisteinei).



Tirozil - prolil - arginină

Reacţiile pozitive de culoare ale acestui tripeptid sunt:
1. Reacţia biuretului (indică prezenţa legăturilor peptidice);
2. Reacţia xantoproteică (indică prezenţa tirozinei);
3. Reacţia cu ninhidrină.
4.



Triptofil - lizil - tirozil - metionină
(Trp - Lys - Tyr - Met)

5. Conform regulilor matematicii, numărul de izomeri va fi: 1×2×3 = 6.

6. Compusul nu este un peptid, deoarece el dă reacţia biuretică negativă ceea ce indică absenţa legăturilor peptidice. Din cauză că compusul

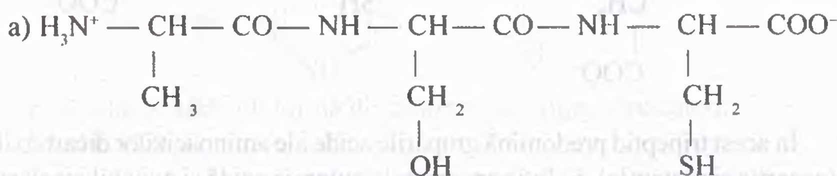
reacţionează cu ninhidrina, formînd un complex de culoare albastră - violetă, el prezintă un α-aminoacid sau o amină.

7. Reacţia lui Fol indică prezenţa în proteine a aminoacizilor ce conţin sulf legat slab - cisteina şi cistina. Însă şi alţi compuşi organici şi anorganici ai sulfului, de exemplu tiolii, prezenţi în lichidul biologic dau reacţia Fol pozitivă, deci apare un precipitat negru de sulfură de plumb.

8. Reacţia cu ninhidrină este o reacţia caracteristică de culoare a α-aminoacizilor (coloraţie albastră - violetă) şi deci reacţia pozitivă indică prezenţa aminoacizilor liberi în soluţie.

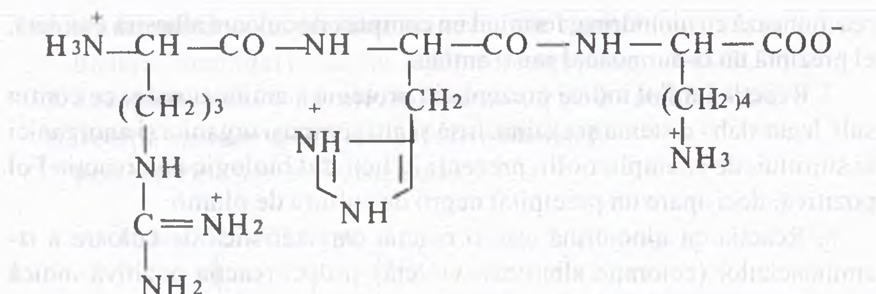
9. Hidroliza completă a proteinei duce la scindarea hidrofilică a tuturor legăturilor peptidice. De aceea sfîrşitul hidrolizei se poate stabili cu ajutorul reacţiei biuretului care în acest caz va fi negativă (coloraţie albastră), dar nu pozitivă (coloraţie violetă), ca în cazul hidrolizei incomplete.

10.

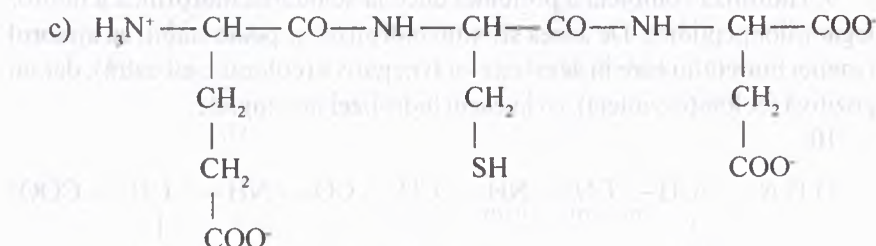


Funcţia alcool din serină nu posedă proprietăţi acido - bazice, iar funcţia tioalcool din cisteină este acid foarte slab şi se ionizează într-o măsură neglijabilă. Grupările care determină pH-ul mediului sunt grupările $-NH_3^+$ şi $-COO^-$. În apă pură gruparea $-NH_3^+$ donează mai mulţi protoni decît acceptă ionul $-COO^-$ din care cauză soluţia apoasă a acestui tripeptid este slab acidă şi punctul izoelectric (pI) este situat într-un mediu slab acid (pI<7).

b) Lizina, arginina şi histidina sunt aminoacizi bazici datorită prezenţei în radicalii lor a funcţiei aminice (în lizină), a grupării guanidinice (în arginină) şi a nucleului heterociclic al imidazolului (în histidină). Deci, în tripeptidul dat predomină grupările bazice şi la dizolvarea lui în apă formează o soluţie slab alcalină. Punctul izoelectric (pI) este situat într-un mediu slab alcalin (pI = 7-10).



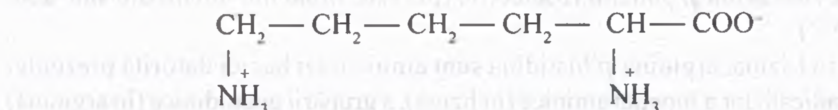
c)



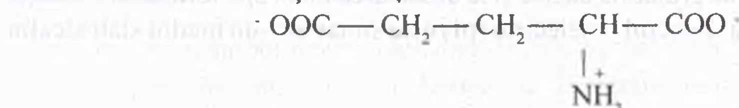
În acest tripeptid predomină grupările acide ale aminoacizilor dicarboxilici (aspartic şi glutamic). Soluţia apoasă este puternic acidă şi punctul izoelectric este situat într-un mediu puternic acid.

11. În soluţii aminoacizii se află în stare ionizată (ion amfoter, anion sau cation) care depinde de pH-ul soluţiei.

Spre catod vor migra următorii aminoacizi: lizina şi arginina, deoarece ei sunt aminoacizi diaminomonocarboxilici şi în soluţie se găsesc sub formă de cationi:



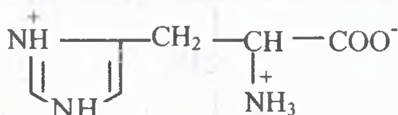
Spre anod va migra acidul glutamic, deoarece el este un aminoacid monoaminodicarboxilic şi în soluţie se află în formă anionică:



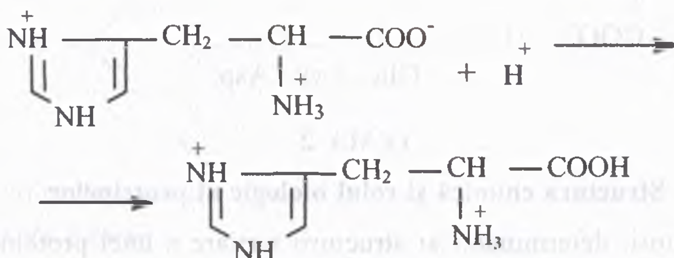
Aminoacizii glicina, alanina şi valina sunt aminoacizi monoaminocarboxilici,

şi deci, în soluţie se află sub formă de ioni amfoteri. Punctul izoelectric al acestor aminoacizi este cca 6,0 şi deci la electroforeză ei nu se deplasează nici spre catod, nici spre anod, ci rămîn la locul de start.

12. Punctul izoelectric al histidinei este pI = 7,58.

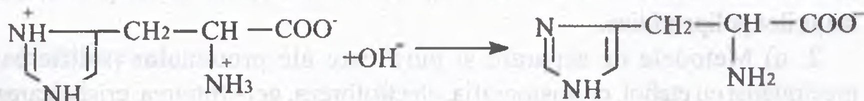


La pH = 4,0



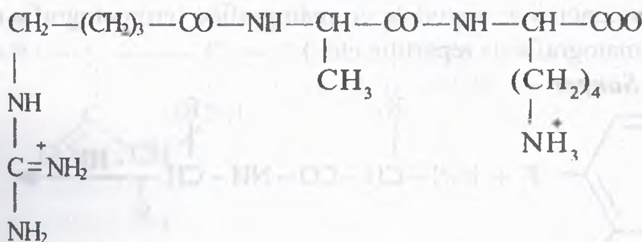
Histidina se află sub formă de cation şi va migra spre catod.

La pH=12,0



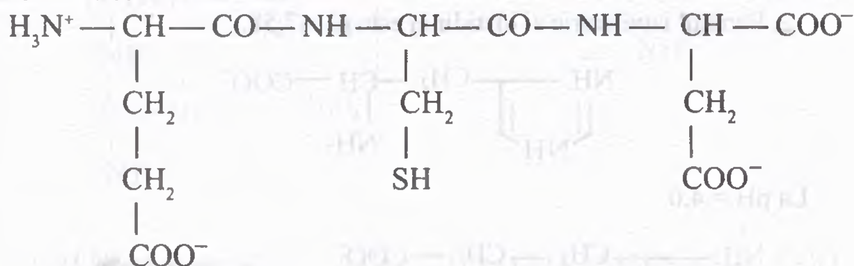
Histidina se află sub formă de anion şi va migra spre anod.

13. Într-un astfel de tripeptid predomină aminoacizi diaminomonocarboxilici. Deci, el posedă sarcină electrică pozitivă din care cauză punctul izoelectric se află într-un mediu alcalin:



Arg - Ala - Lyz

14. Într-un astfel de tripeptid predomină aminoacizi monoamino-dicarboxilici. Deci el posedă sarcină electrică negativă din care cauză punctul izoelectric se află într -un mediu acid.



Glu - Cys - Asp

TEMA 2

Structura chimică şi rolul biologic al proteinelor

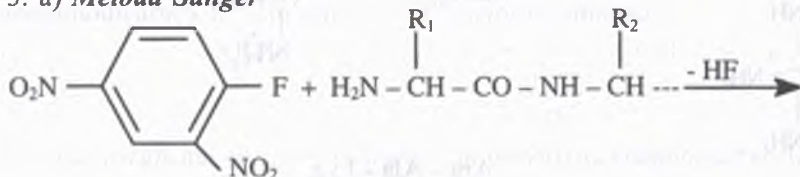
1. Factorii determinanţi ai structurii terţiare a unei proteine sunt interacţiunile necovalente între radicali (R), punţile de hidrogen, legăturile ionice, interacţiunile hidrofobe. Resturile de cistienil formează legături covalente disulfurice -S-S- care leagă covalent regiuni mai depărtate ale lanţurilor polipeptidice.

2. a) Metodele de separare şi purificare ale proteinelor (salifierea, precipitarea cu etanol, cromatografia, electroforeza, gel - filtrarea, cristalizarea etc.) pentru obţinerea proteinei individuale.

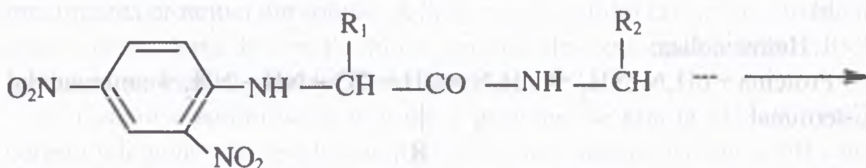
b) Hidroliza completă a proteinei obţinute, hidroliză acidă, alcalină sau enzimatică, şi obţinerea hidrolizatului de proteină care prezintă un amestec de aminoacizi constituenţi ai proteinei.

c) Pentru identificarea aminoacizilor din hidrolizat sunt utilizate reacţiile de culoare ale aminoacizilor, metodele cromatografice (cromatografia de schimb ionic, cromatografia de repartiţie etc.).

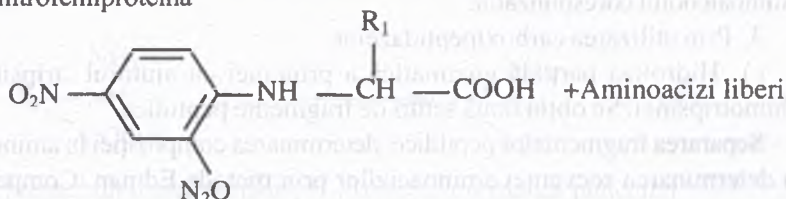
3. a) ***Metoda Sanger***



2 , 4 - Dinitrofluorbenzen

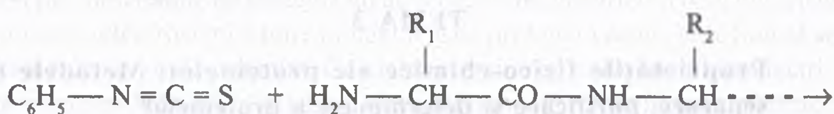


Dinitrofenilproteină

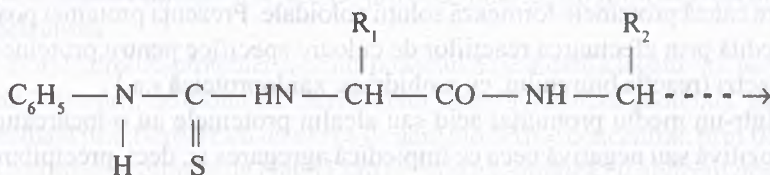


Dinitrofenilaminoacid

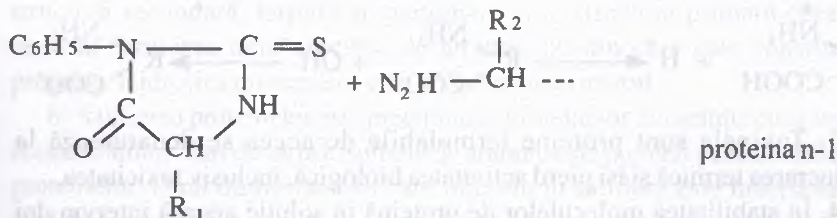
Metoda Edman



Fenilizotiocianat



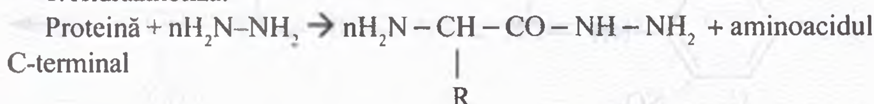
Derivat feniltiohidantonic al proteinei



Derivat feniltiohidantonic al aminoacidului N - terminal.

b)

1. Hidrazinoliza:



Proteină + $nH_2N{-}NH_2 \rightarrow nH_2N - \underset{\displaystyle R}{\underset{|}{CH}} - CO - NH - NH_2$ + aminoacidul C-terminal

2. Reducere cu $LiBH_4$ - aminoacidul C-terminal se transformă în aminoalcoolul corespunzător.

3. Prin utilizarea carboxipeptidazelor.

c) Hidroliza parţială enzimatică a proteinei cu ajutorul tripsinei şi chimotripsinei. Se obţin două seturi de fragmente peptidice.

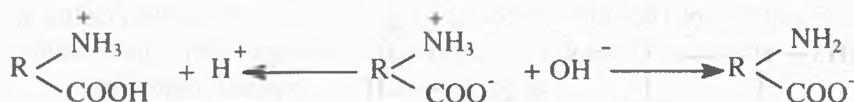
Separarea fragmentelor peptidice, determinarea compoziţiei în aminoacizi şi determinarea secvenţei aminoacizilor prin metoda Edman. Compararea secvenţelor aminoacidice ale celor două seturi de fragmente peptidice şi stabilirea secvenţei aminoacidice a proteinei.

TEMA 3

Proprietăţile fizico-chimice ale proteinelor. Metodele de separare, purificare şi determinare a proteinelor

1. Moleculele de proteină au dimensiuni ce corespund particulelor coloidale din care cauză proteinele formează soluţii coloidale. Prezenţa proteinei poate fi dovedită prin efectuarea reacţiilor de culoare specifice pentru proteine şi aminoacizi (reacţia biuretului, cu ninhidrina, xantoproteică ş.a.) .

2. Într-un mediu pronunţat acid sau alcalin proteinele au o încărcătură netă pozitivă sau negativă ceea ce împiedică agregarea şi, deci, precipitarea moleculelor de proteină din soluţie.



$$R\!\begin{cases} \overset{+}{N}H_3 \\ COOH \end{cases} + H^+ \longleftarrow R\!\begin{cases} \overset{+}{N}H_3 \\ COO^- \end{cases} + OH^- \longrightarrow R\!\begin{cases} NH_2 \\ COO^- \end{cases}$$

3. Toxinele sunt proteine termolabile de aceea se denaturează la prelucrarea termică şi îşi pierd activitatea biologică, inclusiv toxicitatea.

4. În stabilitatea moleculelor de proteină în soluţie apoasă intervin doi factori: apa de hidratare din molecula de proteină şi sarcina electrică pe

care o posedă proteina. Îndepărtarea acestor factori duce la agregarea şi precipitarea proteinei din soluţie. Adăugarea etanolului la o soluţie proteică apoasă creşte forţa de atracţie dintre sarcinile de semn opus scăzînd astfel gradul de ionizare al grupelor R ale proteinei.

5. Deoarece solubilitatea minimă a proteinei se află la pH - 9,1 care corespunde punctului izoelectric pI al proteinei, această valoare a pH - lui indică că în proteină predomină aminoacizi diaminomonocarboxilici - lizina, arginina.



Se prepară un sistem tampon pH-ul căruia corespunde punctului izoelectric al proteinei. În acest sistem tampon se introduce amestecul de proteine. Proteina cu pI egal cu pH-ul sistemului tampon se va precipita deoarece la acest pH moleculele de proteină nu au încărcătură electrică şi deci nu există respingere electrostatică între moleculele de proteină vecine, care tind să se aglomereze şi să se precipite. Celelalte proteine cu valori de pI izoelectric deasupra sau dedesubtul pH-lui sistemului tampon, rămîn în soluţie întrucît ele au o sarcină electrică netă de acelaşi semn. Acest procedeu de separare a proteinelor dintr-un amestec de proteine poartă denumirea de precipitare izoelectrică.

6. a) Hidroliza proteinei prezintă procesul de scindare a legăturilor peptidice -CO-NH- prin adiţionarea elementelor apei. Hidroliza proteinei poate fi efectuată prin fierbere cu un exces de acid clorhidric concentrat, prin fierbere cu soluţii concentrate de NaOH sau pe cale enzimatică cu ajutorul pepsinei, tripsinei etc. În caz de hidroliză dispar nu numai nivelurile superioare de structură secundară, terţiară şi cuaternară ci şi structura primară ceea ce duce la formarea unui amestec de aminoacizi din care este constituită proteina. Hidroliza proteinelor este un proces ireversibil.

b) Salifierea proteinelor este precipitarea proteinelor din soluţie cu ajutorul concentraţiilor mari de săruri. Sulfatul de amoniu este preferat pentru salifierea proteinelor. Unul dintre factorii care intervin în salifiere este îndepărtarea apei de hidratare din molecula proteinei de către concentraţia mare de sare, ceea ce duce la scăderea solubilităţii acesteia.

Salifierea este un procedeu important pentru separarea amestecurilor de proteine, deoarece fiecare proteină răspunde diferit la concentrația sărurilor neutre (de exemplu, albuminele se precipită prin adăugare de soluție saturată de $(NH_4)_2SO_4$, iar globulinele - soluție semisaturată de sulfat de amoniu). Proteinele precipitate prin salifiere își păstrează conformația lor nativă și pot fi dizolvate din nou.

c) Modificarea conformației native a unei proteine poartă denumirea de denaturare, iar agenții care o provoacă sunt agenți denaturanți. În cursul denaturării unei proteine legăturile peptidice nu sunt rupte, deci structura primară rămîne intactă, spre deosebire de legăturile slabe necovalente care determină structurile de ordin superior ale unei proteine – secundară, terțiară, cuaternară.

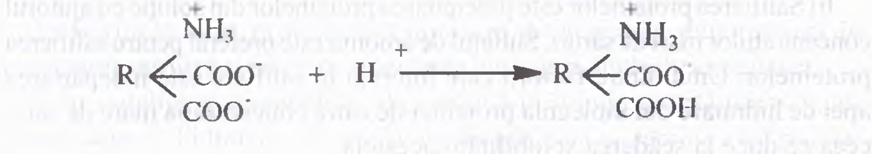
Caracteristica cea mai semnificativă a denaturării este faptul că proteina își pierde activitatea sa biologică specifică. Denaturarea este ireversibilă, însă în unele cazuri molecula denaturată proteică revine spontan la forma sa nativă, proces numit renaturare. Agenții denaturanți sunt temperaturile de 60-70 C°, radiațiile, pH -urile extreme, ureea, guanidina etc.

7. a) Solvenții organici acționează asupra interacțiunilor hidrofobe din conformația nativă a proteinei. Totuși la temperaturi joase etanolul și acetona nu posedă acțiune denaturantă.

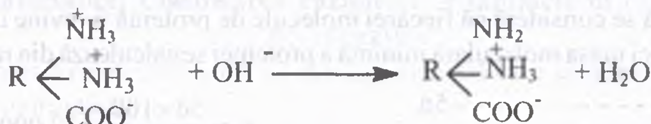
b) Acizii și bazele destabilizează structura proteinelor acționînd asupra legăturilor electrostatice și schimbînd raporturile de vecinătate între sarcinile + și - de pe suprafața moleculei.

c) Ureea și guanidina formează cu proteina numeroase legături de hidrogen dezorganizînd astfel structura ei. Însă acțiunea acestor agenți este ușor reversibilă – după îndepărtarea ureei sau a guanidinei legăturile de hidrogen se reconstituie în cuprinsul moleculei proteice în același număr și în aceleași poziții ca în proteina nativă.

8. Majoritatea proteinelor au punctul izoelectric într-un mediu slab acid, deoarece în ele predomină grupările carboxil libere:



Protaminele şi histonele sunt proteine bazice cu conţinut înalt de acizi diaminocarboxilici - lizina şi arginina, din această cauză punctul lor izoelectric se găseşte într-un mediu slab alcalin:



9. a) La pH - 4,0 histonele au sarcină netă pozitivă şi deci se află sub formă cationică, direcţia de migrare - spre catod.

b) pH - 9,5 corespunde punctului izoelectric şi histonele nu migrează nici spre catod, nici spre anod.

10. Proteinele prezintă coloizi liofili, şi deci pot forma geluri. Particulele coloidale de proteină interacţionează între ele şi apare o structură reticulară internă din care cauză viscozitatea soluţiei creşte. Formarea de gel se observă la coagularea sîngelui (formarea reţelei de fibrină).

Formarea gelului depinde de: 1. Concentraţia soluţiei.
2. Temperatură.
3. Concentraţia ionilor de hidrogen.
4. Prezenţa electroliţilor.

Formarea gelurilor se produce la creşterea concentraţiei soluţiei, la scăderea temperaturii, în punctul izoelectric se observă o viteză maximă de formare a gelului. Ionul SO_4^{2-} facilitează transformarea solului în gel.

11. Xerogelul prezintă gel secat, deci gelul lipsit de lichid. Ca exemplu de xerogeluri poate servi cauciucul, celuloza, gelatina uscată şi alte proteine (albumina ş.a.).

12. Secarea liofilă a soluţiilor coloidale constă în îndepărtarea lichidului (apei) din soluţia coloidală şi obţinerea xerogelului. Procedeul se efectuează în vid. Xerogelurile obţinute se păstrează un timp mai îndelungat ceea ce prezintă importanţă practică în industria de preparare a medicamentelor de origine proteică.

13. Proteinele globulare în soluţie pot fi uşor separate de substanţele cu masă moleculară mică prin dializă şi ultrafiltrare. Pentru aceasta se utilizează o membrană semipermeabilă (celofanul sau alte materiale sintetice) care reţine moleculele de proteină şi lasă sa treacă moleculele mici solubile, aşa ca glucoza sau sulfatul de amoniu, şi moleculele de apă. În dializă îndepărtarea

substanţelor cu masă moleculară mică se efectuează prin înlocuirea de cîteva ori a fazei apoase exterioare cu apă distilată, iar în ultrafiltrare se utilizează presiunea sau forţa centrifugă.

14. Dacă se consideră că fiecărei molecule de proteină îi revine un atom de fier, atunci masa moleculară minimă a proteinei se calculează din raportul:

0,34% - - - - - - - - - - - - - 56

100% - - - - - - - - - - - - - - - x

$$x = \frac{56 \times 100}{0{,}34} = 17.000Da$$

15. Dacă proteina conţine un singur rest de triptofan, atunci masa moleculară a proteinei se calculează din raportul:

0,6% - - - - - - - - - - - - - 204

100% - - - - - - - - - - - - - - x

$$x = \frac{204 \times 100}{0{,}6} = 34.000Da$$

16. Alcoolul etilic şi iodul fac parte din remediile antiseptice - preparate care au o acţiune puternică antimicrobiană. Aceste substanţe prezintă agenţi denaturanţi şi deci provoacă denaturarea proteinelor bacteriilor din care cauză etanolul şi iodul posedă acţiune bacteriostatică şi bactericidă. Antisepticele sunt utilizate în practica chirurgicală la dezinfectarea mîinilor chirurgului şi cîmpului de operaţie, în tratamentul plăgilor, în tratamentul bolilor purulente ale pielii şi mucoaselor.

17. Sărurile metalelor grele sunt agenţi precipitanţi, deci conduc la sedimentarea proteinelor din soluţie.

Proteina denaturată fixează ionii mineralelor grele şi antrenează după sine în precipitat ionii metalelor grele. Această circumstanţă este folosită în practica medicală: în intoxicaţiile cu săruri ale metalelor grele, de exemplu, cu substrat coroziv. Bolnavului i se administrează în calitate de antidot mari cantităţi de albuş de ou sau lapte. Proteinele formează în stomac cu sărurile metalelor grele precipitate insolubile, astfel fiind curmată absorbţia ionilor toxici de metal.

TEMA 4

Natura chimică şi structura enzimelor. Mecanismul acţiunii enzimatice. Clasificarea enzimelor. Vitaminele în calitate de coenzime

1. În experienţe este utilizată amilaza salivară care scindează amidonul pe cale hidrolitică.

Toate enzimele sunt de natură proteică. Natura proteică a amilazei este dovedită prin faptul că dacă asupra amilazei acţionăm cu o enzimă proteolitică, de exemplu cu pepsina, atunci se produce hidroliza amilazei şi enzima îşi pierde capacitatea de a scinda amidonul.

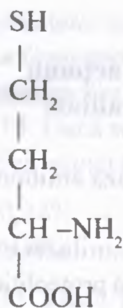
Atît amilaza cît şi acidul sulfuric (catalizator nebiologic) pot scinda amidonul. Diferenţa de acţiune constă în aceea că amilaza hidrolizează amidonul în condiţii blînde ($t = 37C^{o}$), pe cînd acidul sulfuric scindează amidonul la fierbere.

2. În organismele animale vitaminele nu reprezintă materiale structurale de felul proteinelor, glucidelor, lipidelor şi nu au valoare energetică, dar îndeplinesc roluri funcţionale importante. Majoritatea vitaminelor sunt constituenţi coenzimatici, participînd la multiple şi variate reacţii metabolice. Carenţa de vitamine în raţia alimentară duce la stări patologice specifice numite hipo- şi avitaminoze.

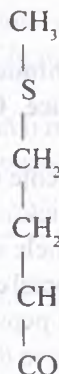
De exemplu, vitamina B_1 (tiamina) din alimente este supusă fosforilării cu ATP în celulele diverselor organe şi ţesuturi cu formare de coenzimă tiaminpirofosfat care participă în reacţia de decarboxilare oxidativă a α-cetoacizilor (piruvat, α-cetoglutarat) şi în reacţia de transcetolare. Deci, în carenţa de vitamină B_1 în organism se acumulează acidul piruvic ceea ce atrage o serie de manifestări patologice: crampe musculare, fenomene toxice pentru sistemul nervos, modificări cardiace, iritabilitate, edeme etc.

3. Există două coenzime B_{12}-metilcobalamină şi 5'-dezoxiadenozilcobalamină.

Metilcobalamina funcţionează ca transportor al grupei metil de la N-metiltetra-hidrofolat la homocisteină care prin metilare se transformă în metionină.

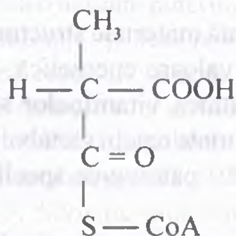



Homocisteinmetiltransferază

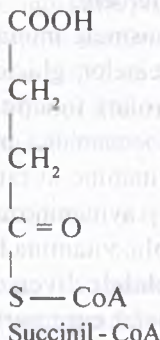


Homocisteină Metionină

Dezoxiadenozilcobalamina participă în reacţia de transformare a L-metil-malonil-CoA în succinil-CoA:



Mutaza



Metilmalonil-CoA Succinil - CoA

4. Centrul activ al enzimei nu poate fi separat, deoarece în centrele active ale enzimelor s-au evidenţiat grupări chimice de tip carboxil, amino, hidroxil şi tio care aparţin resturilor de aminoacizi situaţi în diferite poziţii în lanţul polipeptidic al proteinei - enzimă. Astfel, în centrul activ al chimotripsinei s-au identificat gruparea OH a serinei din poziţia 195, gruparea carboxil a acidului aspartic din poziţia 102 şi nucleul imidazolic al histidinei din poziţia 57. Ele sunt apropiate în spaţiu ca urmare a conformaţiei spaţiale a chimotripsinei.

5.Centrul activ al enzimelor de natură exclusiv proteică este constituit în întregime din proteine şi include următorii aminoacizi împreună cu grupările lor funcţionale: serina, cisteina, histidina, tirozina, lizina ş.a. În situsul activ al

enzimelor de natură heteroproteică constituite din două componente, coenzimă şi apoenzimă, se găsesc atît resturile de aminoacizi, cît şi coenzimă.

6. Unele enzime în afară de centrul activ, care îndeplineşte rol catalitic şi de fixare a substratului, mai conţin şi alt centru spaţial, numit centru alosteric la care se fixează nu substratul, ci alţi compuşi, denumiţi modulatori alosterici. Modulatorii schimbă activitatea enzimei în direcţia creşterii activităţii (activatori alosterici). Astfel de enzime poartă denumirea de enzime alosterice, iar reglarea activităţii lor - reglare alosterică. S-a stabilit că produsul final al unei căi metobolice de biosinteză este inhibitorul alosteric al enzimei care catalizează prima din şirul reacţiilor implicate în biosinteză. Acest tip de inhibiţie se numeşte inhibiţie prin produs final, inhibiţie de tip feedback sau retroinhibiţie.

7. Toate trei enzime fac parte din clasa hidrolazelor care catalizează reacţii de tipul: R-R* + HOH = R-H + R*-OH. α-amilaza (EC 3.2.1.1.) face parte din subclasa hidrolazelor care acţionează asupra compuşilor glucozidici (hidrolaze glicozidice).

Pepsina (EC 3.4.4.1.) face parte din subclasa hidrolazelor care acţionează asupra legăturilor peptidice (hidrolaze peptidice).

Lipaza (EC 3.1.1.3.) face parte din subclasa hidrolazelor care acţionează asupra esterilor carboxilici şi hidrolizează triacilglicerolii.

8. 1. Oxidoreductaze.
2. Transferaze.
3. Hidrolaze.
4. Liaze.
5. Izomeraze.
6. Ligaze.

TEMA 5

Influenţa factorilor de mediu asupra activităţii enzimatice. Determinarea activităţii enzimatice. Efectorii enzimatici

1. Specificitatea de substrat a enzimelor de natură heteroproteică depinde de apoenzimă, deoarece un număr relativ restrîns de cofactori, în special coenzimele în asociere cu diferite apoenzime, dau naştere unui număr foarte mare de heteroenzime, există cîteva sute de dehidrogenaze a căror coenzimă este nicotinamidadenindinucleotidul (NAD^+); piridoxalfosfatul joacă rol de coenzimă în reacţiile de transaminare a aminoacizilor,

în reacțiile de decarboxilare a aminoacizilor, participă la procesul de transsulfurare, este parte integrală a glicogenfosforilazei.

2. Determinarea izoenzimelor lactatdehidrogenazei (LDH) în serul sanguin prezintă valoare diagnostică specifică. Astfel, creşterile de LDH_1 şi LDH_2 cu LDH_1 mai mare decît LDH_2 sunt specifice pentru infarctul miocardic (miocardul este organ cu fosforilare oxidativă intensă), iar creşterile de LDH_1 şi LDH_2 cu LDH_2 mai mare ca LDH_1 sunt caracteristice pentru anemia megaloblastcă, anemia pernicioasă, stări hemolitice. LDH_5 este crescut în necroza hepatică şi uneori în procesele neoplazice.

Izoenzima fosfatazei acide tartrico-sensibilă creşte în carcinomul de prostată metastazat.

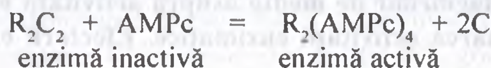
În infarctul miocardic paralel cu creşterea creatinfosfokinazei (CPK) se produc creşteri ale izoenzimei CPK/MB (forma MB fiind de provenienţă strict miocardică). Investigarea izoenzimelor fosfatazei alcaline (hepatobiliară, osoasă şi intestinală) permite localizarea leziunii care determină creşterea. Astfel, fosfataza alcalină osoasă are valori ridicate în rahitism, boala Paget, hiperparatiroidism, osteosarcoame, metastaze osteoblastice. Fosfotaza alcalină hepatobiliară creşte în colectaza intra- şi extrahepatică.

3. Există mai multe modalități de activare a enzimelor:

a) Activarea prin ioni. Unii ioni metalici (Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}) şi unii anioni (Cl^-) acționează drept activatori specifici pentru anumite enzime;

b) Activarea prin transformarea proenzimei în enzimă, spre exemplu, enterodicinaza, îndepărtează din tripsinogen (proenzimă inactivă) un hexapeptid terminal şi îl transformă în tripsină (enzimă activă);

c) Activare prin intervenţie asupra subunităților enzimatice. Protein-kinazele sunt constituite din două tipuri de subunități: R-reglatoare şi C-catalitice. AMP-c se combină cu subunitățile reglatoare şi le detaşează de subunitățile catalitice a căror centre active devin astfel accesibile substratelor



$$\underset{\text{enzimă inactivă}}{R_2C_2} + AMPc = \underset{\text{enzimă activă}}{R_2(AMPc)_4} + 2C$$

d) Activare alosterică. Spre exemplu, fosfofructokinaza - enzimă glicolitică care catalizează reacția fructozo-6-fosfat → fructozo-1,6-difosfat este o enzimă alosterică activată de ADP şi inhibată de ATP;

e) Activarea enzimelor prin procesele de fosforilare-defosforilare. Unele enzime sunt active în forma fosforilată (de exemplu, glicogenfosforilaza), altele în formă defosforilată (de exemplu, glicogensintetaza).

Inhibiţia enzimelor

Inhibiţia enzimelor poate fi reversibilă şi ireversibilă. În inhibiţia ireversibilă legătura enzimă - inhibitor este covalentă, iar în cea reversibilă este slabă.

Inhibiţia reversibilă este de cîteva tipuri:

a) Inhibiţia competitivă. În acest caz inhibitorul este analogul structural şi se află în competiţie pentru centrul activ al enzimei. Reacţiile sunt următoarele:











b) Inhibiţia necompetitivă. În acest caz inhibitorul, structura căruia diferă de regulă destul de mult de structura substratului, se leagă în alt loc decît centrul activ al enzimei. Inhibitorul se combină nu numai cu enzima, formînd complexul EI, ci şi cu ES;

c) Inhibiţie alosterică. Spre exemplu, în calea de biosinteză a colesterolului enzima alosterică β -hidroxi-β-metilglutaril - CoA - reductaza este inhibată de produsul final al acestei căi - colesterolul.

d) Inhibiţie prin exces de substrat. În afară de complexul activ ES se poate forma şi un complex cuprinzînd mai multe substrate - ESS, care este inactiv sau foarte puţin activ.

e) Inhibiţie prin produşi de reacţie. Dacă produsul de reacţie enzimatică se acumulează, el tinde să-şi frîneze propria-i formare. Astfel, glucoza este inhibitorul glucozo - 6 - fosfatazei care catalizează reacţia:



4. a) Influenţa temperaturii asupra activităţii enzimatice s-a demonstrat astfel: la temperatura optimă (38°C) amilaza salivară scindează amidonul (produsele de hidroliză a amidonului nu dau reacţie de culoare pozitivă cu iodul), pe cînd saliva fiartă (s-a produs denaturarea amilazei) nu scindează amidonul şi reacţia cu iodul este pozitivă, deci apare culoare albastră.

Influenţa pH-lui asupra activităţii amilazei salivare s-a demonstrat prin următoarea experienţă: se prepară un şir de soluţii tampon cu diverse valori ale pH-ului care include şi pH-ul optim (6,8) al amilazei salivare. La soluţiile tampon se adaugă salivă ce conţine amilază şi substratul ei – amidonul.

După adăugarea iodului se notează eprubeta unde a avut loc cea mai eficientă scindare a amidonului (cea mai deschisă culoare). pH-ul acestei eprubete corespunde pH-lui optim al amilazei.

b) Specificitatea de acţiune a amilazei se datorează faptului că ea acţionează asupra amidonului (produşii lui de hidroliză - maltoza şi glucoza - dau reacţia Haines pozitivă), şi nu acţionează asupra zaharozei care dă reacţia Haines negativă - coloraţie albastră.

c) Inhibiţia competitivă s-a demonstrat prin acţiunea acidului malonic asupra activităţii succinatdehidrogenazei care catalizează reacţia de oxidare a succinatului în fumarat. Malonatul este inhibitorul competitiv al succinat-dehidrogenazei. Proba de experienţă include succinatdehidrogenaza, succinatul, acceptorul de hidrogen (2,6- diclorfenol-indofenol) şi are loc decolorarea soluţiei. Pe cînd în proba, în care pe lîngă reactivii sus-numiţi se adaugă şi malonat, lichidul nu se decolorează, deoarece oxidarea succinatului nu are loc din cauza inhibiţiei succinatdehidrogenazei de către malonat.

5. O metodă curentă de fracţionare a proteinelor este cromatografia de afinitate. Dacă o proteină este susceptibilă să se combine specific cu un anumit compus, acesta se fixează prin covalenţă pe un suport pulverulent inert şi se umple cu el o coloană de cromatografie. Aplicînd pe coloana astfel pregătită amestecul proteic, va fi reţinută numai proteina care se combină specific cu compusul. Separarea din amestec a proteinei se face cu un eluart potrivit.

6. În patologie mai des se observă creşterea activităţii enzimelor în serul sanguin, decît scăderea activităţii enzimelor plasmatice nefuncţionale. Creşterea se explică fie prin modificări de permiabilitate ale membranelor celulare, fie prin disfuncţii masive ale celulelor producătoare (de exemplu, ale celulelor hepatice în hepatite şi ciroze, a celor din muşchiul cardiac în infarctul de miocard etc.). De aceea dozarea activităţii lor în ser este extrem de utilă medicilor în precizarea diagnosticului şi în urmărirea evoluţiei bolii. De exemplu, după infarctul de miocard creşte activitatea serică a creatinfosfokinazei (CPK), aspartataminotransferazei (AST) şi lactatde-hidrogenezei (LDH). Cea mai rapidă creştere se semnalează în cazul CPK, cea mai lentă la LDH.

7. Pancreatina conţine următoarele enzime: lipaza, fosfolipaza, coleste-rolesteraza, amilaza, tripsina, chimotripsina, elastaza, carboxipeptidaza.

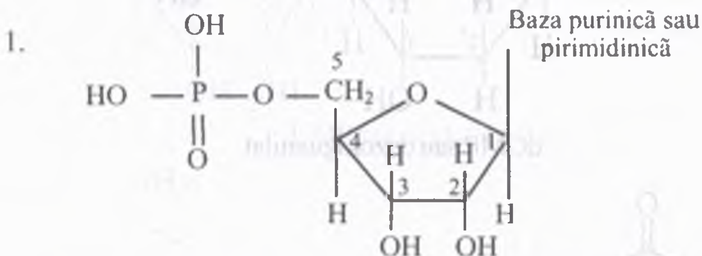
CAPITOLUL II

Nucleotidele. Structura şi biosinteza acizilor nucleici. Sinteza proteinelor şi reglarea ei. Biosinteza anticorpilor

TEMA 6

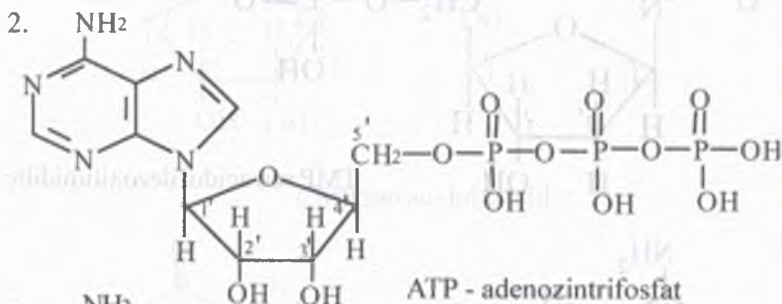
Nucleotidele şi structura covalentă a acizilor nucleici

1.



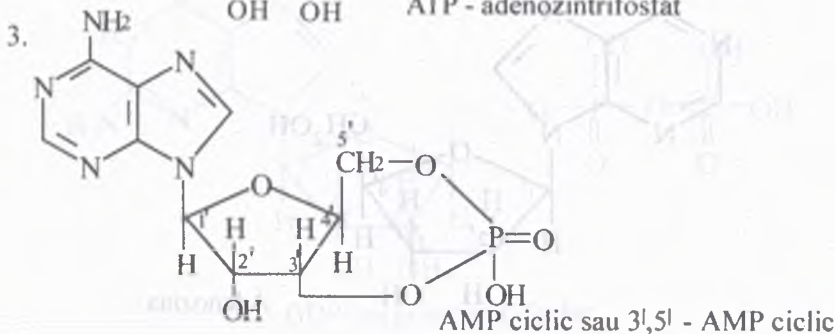
Nucleotidul dat prezintă un ribonucleotid, deoarece componentul glucidic este riboza. În dezoxiribonucleotide gruparea OH din poziţia 2 este subsituită cu H.

2.



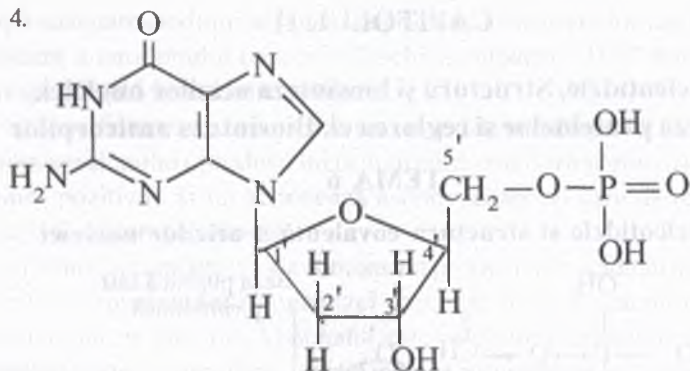
ATP - adenozintrifosfat

3.



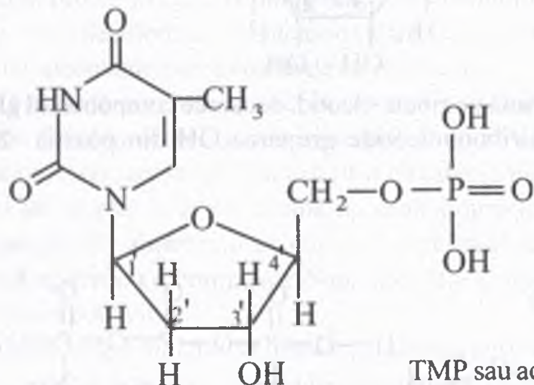
AMP ciclic sau 3',5' - AMP ciclic

4.



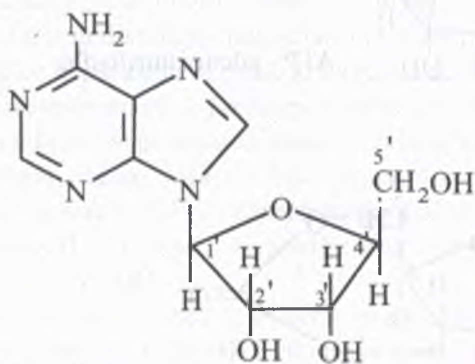
dGMP sau dezoxiguanilat

5.



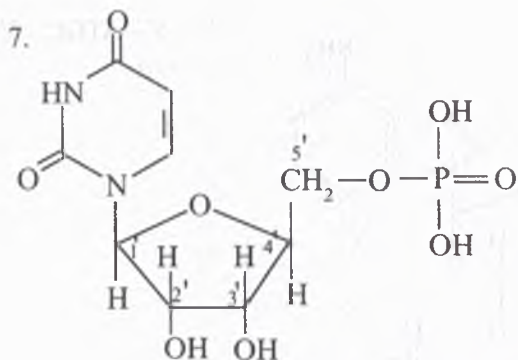
TMP sau acidul dezoxitimidilic

6.



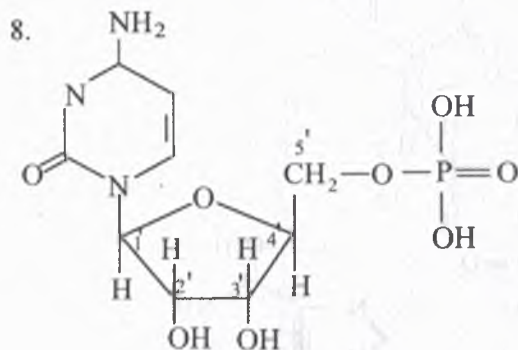
Adenozina

7.



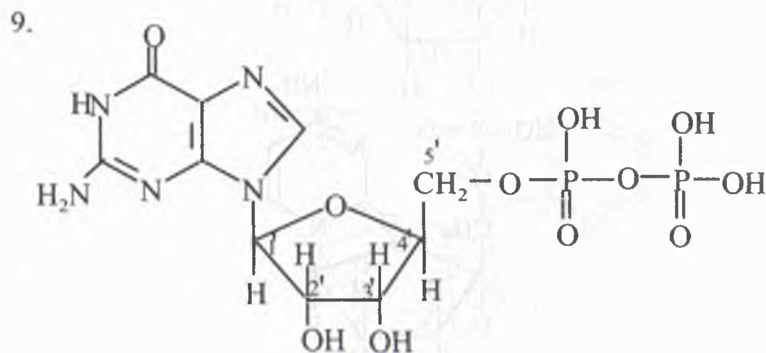
UMP sau acidul uridilic

8.



CMP sau acidul citidilic

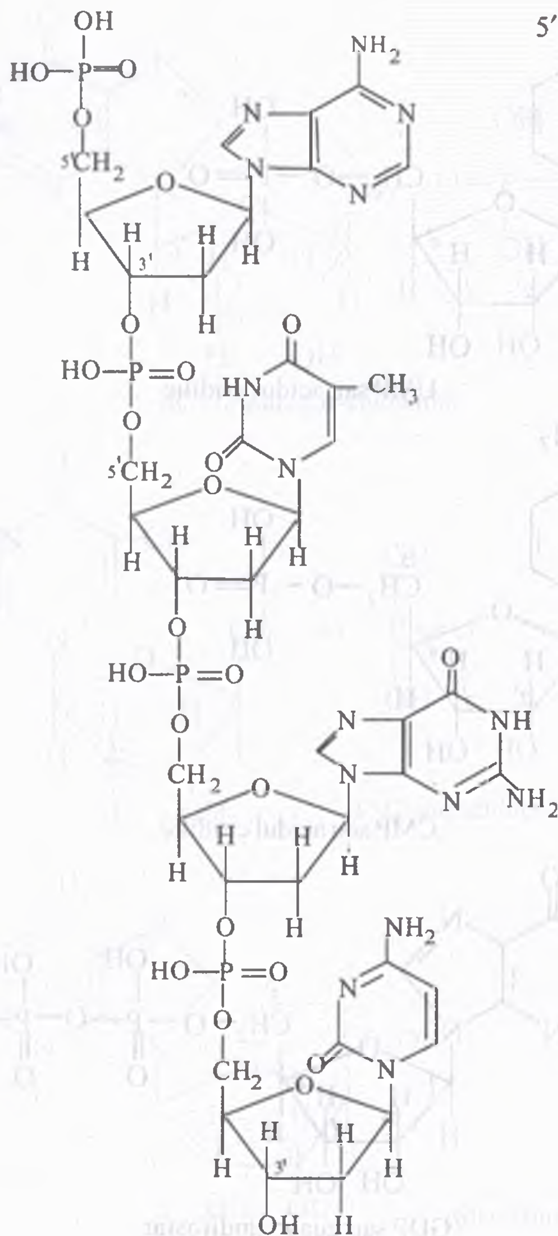
9.



GDP sau guanozindifosfat

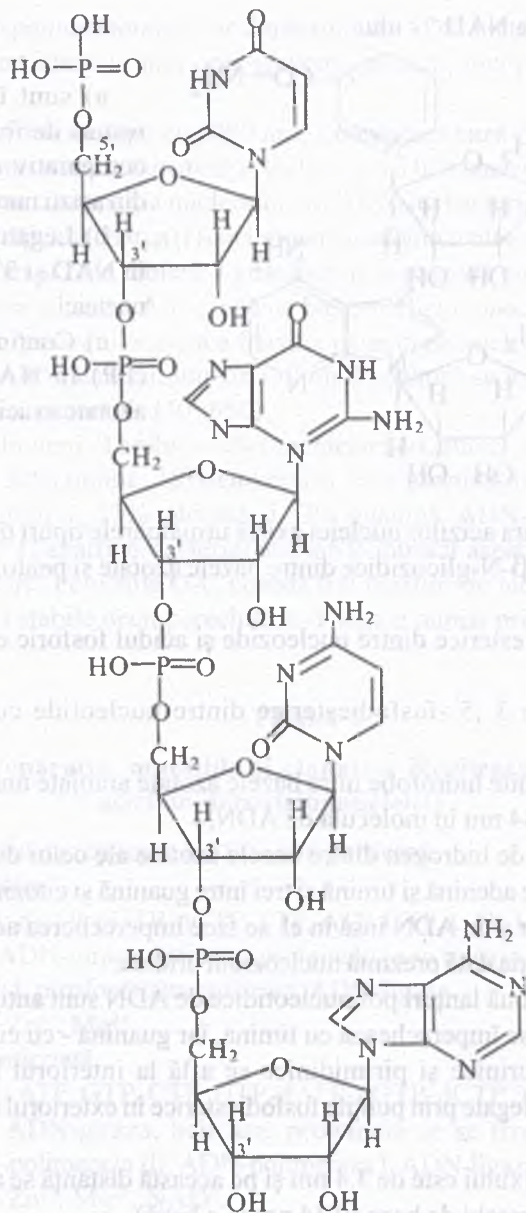
10.

5′ - ATGC - 3′



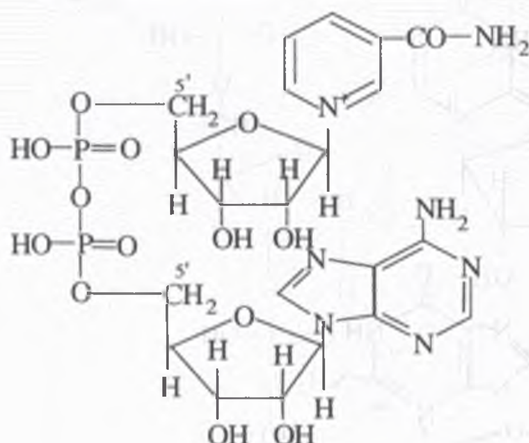
OH
HO—P=O
O
5'CH2
O
N
N
NH2
N
N
H
H
H
3'
H
H
O
HO—P=O
O
5'CH2
HN
O
CH3
O
N
O
H
H
H
H
H
O
HO—P=O
O
CH2
O
N
N
O
NH
N
NH2
H
H
H
H
H
O
HO—P=O
O
CH2
O
NH2
N
O
N
H
H
H
3'
H
OH
H

11.



5' - UGCA -3'

12. Structura NAD^+ - ului



a) sunt legate prin 2 resturi de fosfat în NAD, comparativ cu 1 din cele din acizii nucleici.

b) Legătura este 5'- 5' în NAD şi 3' – 5' în acizii nucleici.

c) Conţine o vitamină (PP) în NAD şi 2 baze azotate în acizii nucleici.

13. În structura acizilor nucleici există următoarele tipuri de legături:

1) legăturile β-N-glicozidice dintre bazele azotate şi pentoze cu formare de nucleozide;

2) legăturile esterice dintre nucleozide şi acidul fosforic cu formare de nucleotide;

3) legăturile 3' ,5' -fosfodiesterice dintre nucleotide cu formare de polinucleotide;

4) interacţiunile hidrofobe între bazele azotate aranjate una peste alta la o distanţă de 0,34 nm în molecula de ADN;

5) legăturile de hidrogen dintre bazele azotate ale celor două lanţuri de ADN; două între adenină şi timină şi trei între guanină şi citozină. Legăturile de hidrogen apar şi în ADN însă în el se face împerecherea adenină-uracil.

14. Combinaţia dată prezintă nucleozidul uridina.

15. a) Cele două lanţuri polinucleotidice de ADN sunt antiparalele.

b) Adenina se împerechează cu timina, iar guanina - cu citozina.

c) Bazele purinice şi pirimidinice se află la interiorul helixului, iar dezoxiribozele, legate prin punţile fosfodiesterice în exteriorul duplexului de ADN.

d) Pasul helixului este de 3,4 nm şi pe această distanţă se află 10 nucleotide, deci 10 perechi de baze (0,34 nm la o bază).

e) Lanţurile polinucleotidice ale duplexului de ADN sunt complementare, însă ele nu sunt identice nici prin secvenţa bazelor, nici prin compoziţia nucleotidică.

16. Un micron este egal cu 1000 nm. Deoarece o bază ocupă o distanţă egală cu 0,34 nm, reiese că un micron include cca 3 000 nucleotide (10^3:0,34).

17. Deoarece compoziţia nucleotidică a ADN-lui bacteriofagului M_{13} nu se supune legităţii lui Chargaff (cota molară a adeninei nu este egală cu cota molară a timinei şi cota molară a guaninei nu este egală cu cota molară a citozinei), reiese că acest ADN nu este bicatenar, ci monocatenar.

18. Întrucît masa moleculară a fiecărei perechi de nucleotide este egală aproximativ cu 650 daltoni, într-un milion de daltoni se vor conţine circa 1540 perechi de nucleotide (10^6:650).

19. Dacă admitem că ambii ADN sunt bicatenari, atunci un ADN conţine 32% adenină, 32% timină, 18% citozină şi 18% guanină, iar celălalt–17% adenină, 17% timină, 33% citozină şi 33% guanină. ADN-ul care conţine 33% G şi 33% C aparţine bacteriei termofile întrucît acest ADN este mai stabil la încălzire. Perechile G-C posedă trei legături de hidrogen din care cauză sunt mai stabile decît perechile A-T legate numai prin două legături de hidrogen.

TEMA 7

Genele: reparaţia, mutaţiile şi clonarea. Replicarea (biosinteza acizilor dezoxiribonucleici)

1. În procesul de replicare a ADN-ului participă:

a. Catena lider.

Precursorii: dATP, dGTP, dCTP, TTP, ATP, GTP, CTP, UTP.

Enzimele: ADN-giraza, helicaza, proteinele ce se fixează la ADN, ADN-polimeraza III, I, pirofosfataza, primaza, ADN-ligaza.

Cofactorii: Zn^{2+}, Mg^{2+}.

b. Catena întîrziată.

Precursorii: ATP, GTP, CTP, UTP, dATP, dGTP, dCTP, TTP.

Enzimele: ADN-giraza, helicaza, proteinele ce se fixează la ADN, primaza, ADN-polimeraza III, ADN-polimeraza I, ADN-ligaza, pirofosfataza.

Cofactorii: Zn^{2+}, Mg^{2+}, NAD^+.

2. Reieşind din principiul împerecherii complementare, compoziţia

nucleotidică a lanţului de ADN sintetizat va fi : A = 32,8% . T = 24,6%, G = 18,5% , C = 24,1%.

3. Compoziţia nucleotidică a ADN-ului fagului ϕ174 constituit din inelele (+) şi (-) se prezintă astfel:

$$G = \frac{24,1+18,5}{2} = 21,3\%$$

$$C = \frac{18,5+24,1}{2} = 21,3\%$$

$$A = \frac{24,6+32,8}{2} = 28,7\%$$

$$T = \frac{32,8+24,6}{2} = 28,7\%$$

4. a) Factorii ce asigură exactitatea replicării ADN-ului sunt:

1.Fidelitatea împerecherii Watson - Crick între catena parentală şi catena fiică (nou sintetizată);

2. Corecţia erorilor cu ajutorul activităţii 3'-exonucleazice şi de corecţie a ADN -polimerazei I şi III. Dacă se produce inserţia unui nucleotid incorect, atunci ADN - polimeraza depistează, îndepărtează nucleotidul incorect şi include nucleotidul corect.

b) Da, lanţul întîrziat se sintetizează cu aceiaşi exactitate ca şi lanţul conducător.

TEMA 8
Transcripţia. Sinteza anticorpilor

1. ARN-polimeraza ADN-dependentă participă la biosinteza ARN-ului pe matriţă de ADN (transcriere) şi necesită prezenţa ADN matriţă a celor patru ribonucleozidtrifosfaţi (ATP, GTP, CTP, UTP), ionilor de magneziu.

ARN - polimeraza conţine zinc şi construieşte o catenă de ARN complementară cu catena ADN-sens pentru o anumită genă în direcţia $5' \rightarrow 3'$.

Polinucleozidfosforilaza participă la sinteza polimerilor similari acizilor ribonucleici cu secvenţă nucleotidică nespecifică. Enzima nu necesită

prezența matriței, ci a celor patru ribonucleoziddifosfați (ADP, GDP, CDP, UDP) sau numai a unuia din ei, și prezența ionilor de magneziu. Compoziția nucleotidică a polimerului rezultat depinde de raportul ribonucleoziddifosfaților din mediu. Rolul polinucleotidfosforilazei constă mai degrabă în degradarea ARN-ului, decît în sinteza ARN-lui.

2.

ADN monocatenar (+)		ADN bicatenar (+)	(-)		ARN
A – 21%		A –21%	T – 21%		A – 21%
G – 29%		G –29%	C – 29%		G – 29%
T – 21%	-------- →	T – 21%	A – 21%	--- →	U – 21%
C – 29%		C – 29%	G – 29%		C – 29%

3. Sanger și colaboratorii au comparat secvența nucleotidică a cromozomului ϕ x 174 cu secvența aminoacizilor celor 9 proteine codificate de genele ϕ x 174 și s-a observat că în ADN-ul bacteriofagului ϕ x 174 există gene suprapuse sau gene în interiorul altor gene care compensează complet insuficiența de nucleotide în ADN-ul ϕ x 174 pentru codificarea tuturor aminoacizilor ce se conțin în cele 9 proteine.

TEMA 9

Sinteza proteinelor și reglarea ei

1. Dacă proteina medie este constituită aproximativ din 330 resturi de aminoacizi, atunci gena care codifică această proteină include cca 10^3 perechi de nucleotide, întrucît fiecare aminoacid este codificat de un triplet de nucleotide. ADN setului haploid al cromozomilor celulei umane poate deci codifica

$$\frac{2{,}3\times10^9}{10^3} = 2{,}3 \text{ milioane de proteine.}$$

Însă o parte de ADN nu intră în compoziția genelor structurale, ci formează intronii și genele reglatoare din care cauză numărul de proteine este cu mult mai mic de 2,3 milioane și prin evaluare aproximativă este egală cu 50 - 200 de mii de diferite proteine.

2. Există două tipuri de ARN_t specifice pentru metionină - ARN_t^{Met} și $ARN_t\ \phi^{Met}$.

Ambele tipuri de ARN_t pot lega metionina în reacţia de activare, însă metionina fixează gruparea formil şi devine aminoacid de iniţiere numai în compoziţia metionil - $ARN_t\phi^{Met}$. Celălalt tip de ARN_t - metionil - ARN_t^{Met}- este utilizat pentru inserţia metioninei în porţiunile interne ale lanţului polipeptidic.

3. Deoarece acelaşi aminoacid poate fi codificat de mai mulţi codoni (codul genetic este degenerat), nu se poate stabili secvenţa nucleotidică a unicului ARN_m care codifică această proteină, folosind tabelul codului genetic.

4. Masa medie a unei perechi de nucleotide este egală cu 650, perechea de nucleotide în duplexul de ADN ocupă o distanţă egală cu 0,34 nm.

a) ARN_t (90 nucleotide);

90 x 0,34 = 30,6 nm

90 x 650 = 58,500 daltoni

b) Ribonucleaza (124 resturi de aminoacizi)

124 x 3 x 0,34 = 126,48 nm

124 x 3 x 650 = 241,800 daltoni

c) Miozina (1800 resturi de aminoacizi)

1800 x 3 x 0,34 = 1836 nm

1800 x 3 x 650 = 3510000 daltoni

5. ARN_m UGU GUG UGU GUG

polipeptid Ala – Val – Ala – Val-

Nu se sintetizează polipeptidul Cys – Val – Cys – Val – (codonul UGU specifică includerea cisteinei în polipeptid) întrucît în sistemul de sinteză a fost utilizat Ala - ARN_t obţinut din ARN_t-Cys. Cu alte cuvinte caracterul interacţiunii aminoacil - ARN_t cu ARN_m este determinat de natura ARN_t, şi nu de aminoacidul fixat la ARN_t (codonul ARN_m recunoaşte codonul ARN_t, dar nu aminoacidul).

6. a. **Activarea aminoacizilor.**

Pentru activarea fiecărui aminoacid se cheltuiesc două legături macroergice ale ATP-lui : 146 x 2 = 292 legături

b. **Elongarea lanţului polipeptidic.**

Formarea unei legături peptidice necesită hidroliza a două molecule de GTP la GDP (două legături macroergice) - 145 x 2 = 290 legături.

c. **Formarea complexului de iniţiere 70 S.**

Acest proces necesită energie rezultată din hidroliza unui GTP (o legătură).
În total : 292 + 290 + 1 = 583 legături macroergice.

7.1) UUA AUG UAU
2) UUG AUG UAU
3) CUU AUG UAU
4) CUC AUG UAU
5) CUA AUG UAU
6) CUG AUG UAU
7) UUA AUG UAC
8) UUG AUG UAC
9) CUU AUG UAC
10) CUC AUG UAC
11) CUA AUG UAC
12) CUG AUG UAC

8. Gena structurală care codifică această enzimă este constituită din 192 x 3 = 576 perechi de nucleotide. Restul perechilor de nucleotide ale genei aparţin intronilor (fragmente noninformaţionale ale genei) sau genei reglatoare şi genei operatoare.

9. a) GGU CAG UCG CUC CUG AUU
Gly – Gln – Ser – Leu – Leu – Ile
b) UUG GAU GCG CCA UAA UUU GCU
Leu – Asp – Ala – Pro – stop
c) AUG GAC GAA
Met – Asp – Glu — eucariote
FormilMet – Asp – Glu — procariote

10.1.Leu -- Phe
UUA UUU
UUG UUC
CUU
CUC
Substituţia Leu ← → Phe e posibilă

2. Ile --- Leu
AUU CUU
AUC CUC
AUA CUA
Substituţia Ile ← → Leu e posibilă

3. Ala – Thr
GCU ACU
GCC ACC
GCA ACA
GCG ACG
Substituţia Ala – Thr e posibilă.

4. Pro --- Ser
CCU UCU
CCC UCC
CCA UCA
CCG UCG
Substituţia Pro – Ser e posibilă.

5. Lys – Ala
AAG GCC

6. His -- Glu
CAU GAA

AAG GCC CAC GAG
GCA
GCG

Substituţia Lys – Ala nu e posibilă. Substituţia His – Glu nu e posibilă.

11.a) (5') ATC GTC GAC GAT GAT CAT CGG CTA CTC GA (3')

Direcţia 3'→5' TAG CAG CTG CTA CTA GTA GCC GAT GAG CT

Direcţia 5'→3' TCG AGT AGC CGA TGA TCA TCG TCG ACG AT

b) Direcţia 3'→5' AGC UCA UCG GCU ACU AGU AGC AGC UGC UA

Direcţia 5'→3' AUC GUC GAC GAU GAU CAU CGG CUA CUC GA

c) Ile – Val – Asp – Asp – Asp – His – Arg–Leu – Leu.

12. Lungimea proteinei (α - spirală liniară) va fi: 150 x 0,15 nm = 22,5 nm, unde 0,15 nm este distanţa ocupată de un rest de aminoacid în α - helix.

Lungimea genei ce codifică această proteină va fi :150 x 3 x 0,34 = 153 nm.

13. În timpul translaţiei, în lanţul polipeptidic se încorporează direct următorii aminoacizi: asparagina şi p - hidroxifenilalanina (tirozina), întrucît aceşti doi aminoacizi posedă cod genetic. 4-Hidroxiprolina şi fosfoserina apar în lanţul polipeptidic în urma modificărilor de posttraducere, ca urmare se include prolina care suferă hidroxilare cu formare de 4-hidroxiprolină, iar fosfoserina apare în urma fosforilării serinei.

14.a) AUU AAU UAA UUA
Ile - Asn - stop

b) AUA UAU AUA UAU
Ile - Tyr - Ile - Tyr

c) UAU UAU UAU UAU
Tyr - Tyr - Tyr - Tyr

d) AUA - AUA - AUA - AUA
Ile - Ile - Ile - Ile

e) UAU AUA UAU AUA
Tyr - Ile - Tyr - Ile

CAPITOLUL III

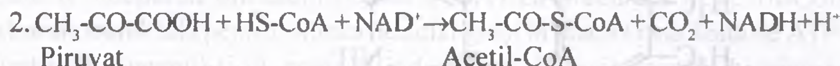
Metabolismul general. Bioenergetica. Oxidarea biologică. Lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă

TEMA 11

Noţiuni generale despre metabolism. Căile generale de scindare ale proteinelor, glucidelor şi lipidelor. Noţiuni de bioenergetică. Oxidarea piruvatului şi ciclul Krebs

1. Sediul ciclului Krebs mitocondrial.

Enzima	*Reacţia*	*Tipul de reacţie*
Citratsintetaza	Acetil-CoA+Oxaloacetat + H_2O < = > Citrat + HS-CoA	Condensare
Aconitaza	Citrat < = > cis - Aconitat< = > Izocitrat	Dehidratare şi hidratare
Izocitratdehidrogenaza	Izocitrat + NAD^+ <=> α-cetoglutarat + NADH + H^+ CO_2	Decarboxilare şi oxidare
Complexul α-cetoglutarat-dehidrogenaza	α-Cetoglutarat + NAD^++HS-CoA<=> Succinil-CoA + CO_2 + NADH + H^+	Decarboxilare şi oxidare
Succinil-CoA-sintetaza	Succinil - CoA + Pi +GDP <=> Succinat + GTP + HS-CoA	Fosforilare la nivel de substrat
Succinat-dehidrogenaza	Succinat +FAD <=> Fumarat + $FADH_2$	Oxidare
Fumaraza	Fumarat + H_2O <=> Malat	Hidratare
Malatdehidrogenaza	Malat + NAD^+ <=> Oxaloacetat + + NADH + H^+	Oxidare

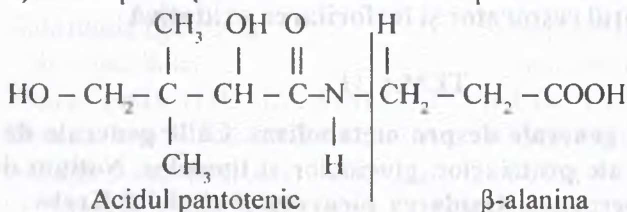


2. CH_3-CO-COOH + HS-CoA + NAD^+ → CH_3-CO-S-CoA + CO_2 + NADH+H^+
Piruvat — Acetil-CoA

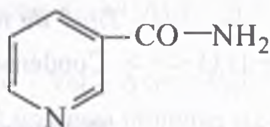
Piruvatul se supune decarboxilării oxidative. Procesul este catalizat de complexul piruvatdehidrogenază. Complexul este constituit din 3 enzime şi 5 cofactori: piruvatdehidrogenază (decarboxilantă), dihidrolipoiltransacetilază, dihidrolipoildehidrogenază, în afară de cofactorii stoichiometrici HS-CoA şi

NAD^+ la reacţie mai participă cofactorii tiaminpirofosfat (TTP), lipoamida şi FAD^+.

a) În componenţa HS-CoA intră acidul pantotenic:

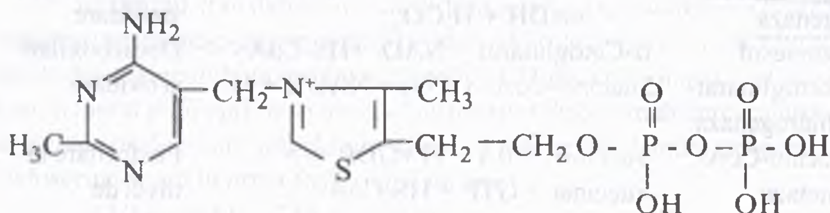


b) Vitamina PP este constituentul NAD^+-ului

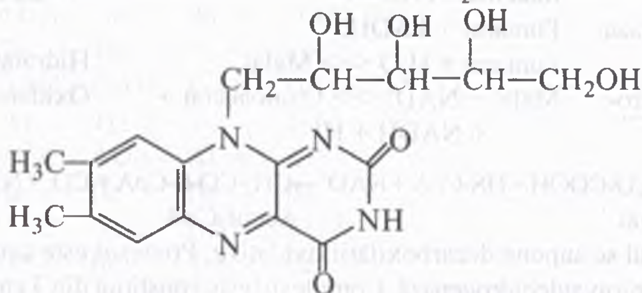


Nicotinamida

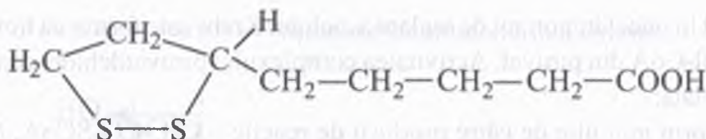
c) Tiaminpirofosfatul este forma coenzimatică a vitaminei B_1 (tiaminei).



d) În componenţa FAD-ului intră vitamina B_2 (riboflavina).



e) Acidul lipoic se leagă covalent cu restul de lizină din dihidrolipoiltransacetilază.



3. Ciclul acizilor tricarboxilici funcţionează numai în condiţii aerobe, deoarece desfăşurarea lui normală necesită NAD^+ şi FAD^+. Aceşti transportatori de electroni regenerează la transferul electronilor NADH şi $FADH_2$ la O_2 pe calea lanţului respirator, care este cuplat cu formarea concomitentă de ATP (fosforilare oxidativă).



4. $ATP + H_2O < = > ADP + Pi$

$\Delta G^o = - 7,3$ kcal /mol, unde ΔG^o este energia liberă standard de hidroliză a ATP-ului.

Fiecare moleculă de ATP este hidrolizată şi din nou regenerată de 2,5 mii de ori în 24 de ore, deci durata vieţii moleculei de ATP este mai puţin de un minut.

5. În 24 ore omul consumă cca 600 l (~27 moli) de oxigen. Majoritatea covîrşitoare a oxigenului (~90%) se reduce pînă la apă cu participarea lanţului respirator. Dacă se consideră că în mitocondrii se reduc 25 moli de oxigen (50 moli de oxigen atomar), iar cîtul P/O = 2,5, atunci în mitocondriile organismului se sintetizează zilnic 50 x 2,5 =125 moli de ATP, adică cca 62 kg de ATP. Fireşte aceeaşi cantitate de ATP este hidrolizată zilnic: această cantitate nu caracterizează masa totală de ATP din organism, ci viteza ciclului ATP-ADP.

6. Ciclul Krebs este o cale amfibolică care funcţionează nu numai în catabolism (oxidarea acetil-CoA ce provine din degradarea aminoacizilor, acizilor graşi şi glucidelor), ci şi în generarea de precursori ori pentru căile anabolice. Intermediarii ciclului Krebs servesc ca precursori ai aminoacizilor: oxalilacetatul este convertit în aspartat, iar α-cetoglutarat - în glutamat. Citratul poate fi îndepărtat din ciclu pentru a servi ca precursor al acetil-CoA extramitocondriale pentru sinteza de acizi graşi în reacţia catalizată de ATP-citratliază. Succinil-CoA poate fi îndepărtată din ciclu pentru biosinteza hemului. Viteza de funcţionare a ciclului Krebs este bine racordată la necesitatea celulelor în ATP.

1. Un punct important de reglare a ciclului Krebs este formarea ireversibilă a acetil-CoA din piruvat. Activitatea complexului piruvatdehidrogenază este controlată:

a) prin inhibiţie de către produşii de reacţie – CH_3-CO-SCoA, NADH;

b) după principiul de retroinhibiţie - ATP inhibă complexul piruvatdehidrogenazic;

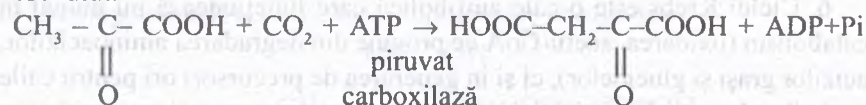
c) prin modificarea covalentă a complexului dehidrogenazic fosforilarea determină diminuarea activităţii lui, iar defosforilarea - creşterea activităţii (kinaza (K) şi fosfataza (F)).

2. O reacţie importantă de reglare a ciclului este sinteza citratului din oxalilacetat şi acetil-CoA. ATP-ul este inhibitorul alosteric al citratsintezei.

3. Altă reacţie aflată sub reglaj este reacţia catalizată de izocitratdehidrogenază care necesită ADP ca modulator alosteric stimulator, dar care este inhibată de ATP sau NADH.

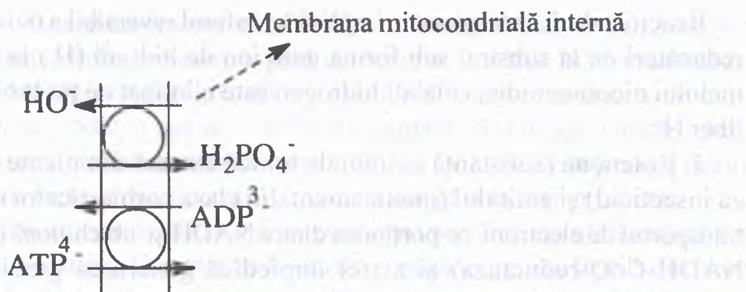
4. A treia reacţie reglatoare a ciclului Krebs este reacţia catalizată de complexul α - cetoglutarat dehidrogenază, inhibat de produşii de reacţie, deci de NADH şi succinil-CoA.

7. Nu este posibilă, deoarece reacţia de decarboxilare a piruvatului este ireversivilă. Compuşii intermediari ai ciclului acizilor tricarboxilici sunt folosiţi ca precursori în procesele de biosinteză. Oxaloacetatul serveşte ca precursor în sinteza aspartatului şi în procesul de gluconeogeneză.Compuşii intermediari utilizaţi sunt refurnizaţi prin reacţii anaplerotice dintre care cea mai importantă este carboxilarea piruvatului la oxalilacetat pe contul ATP-ului.



8. Trecerea ATP şi ADP prin membrana internă mitocondrială este un proces cuplat: ADP pătrunde în matricea mitocondrială numai cu condiţia ieşirii ATP-ului din matrice şi invers. Această difuziune de schimb este mediată de transportorul ATP-ADP-translocază - un dimer constituit din subunităţi identice - şi este inhibată puternic şi specific de glucozida vegetală atractilozida şi de antibioticul acid bongkrecic.

Transportorul de fosfat favorizează un schimb de ioni $H_2PO_4^-$ şi OH^-:



TEMA 12

Oxidarea biologică. Lanţul respirator şi fosforilarea oxidativă

1. Componentele lanţului respirator care participă în fluxul transportului de electroni de la substrate organice la oxigen sunt:

-Dehidrogenazele NAD^+ – dependente;

-Dehidrogenazele FMN - şi FAD - dependente;

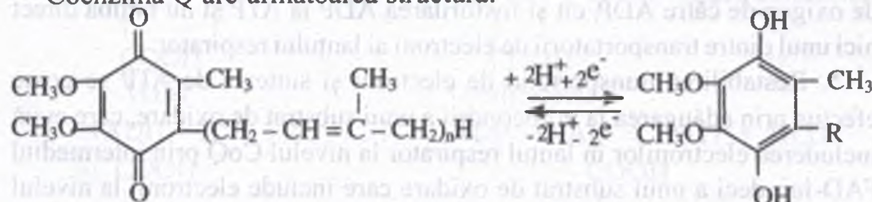
-Proteinele cu fier-sulf;

-Ubichinona sau coenzima Q;

-Citocromii şi $NADP^+$.

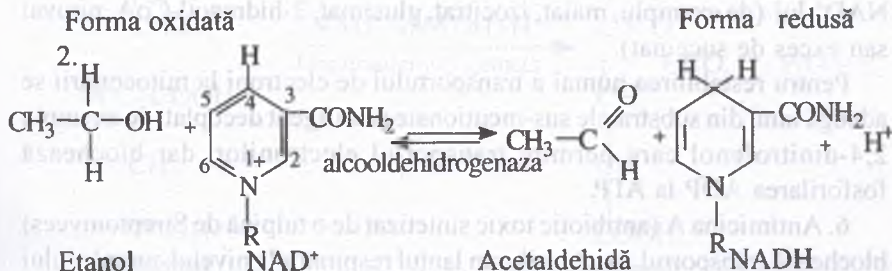
NAD^+ conţine nicotinamida (vitamina PP), FMN şi FAD–riboflavina (vitamina B_2).

Coenzima Q are următoarea structură:



Forma oxidată Forma redusă

2.



Etanol NAD^+ Acetaldehidă NADH

Reacţiile de dehidrogenare implică transferul reversibil a doi echivalenţi reducători de la substrat sub forma unui ion de hidrură (H^-) la poziţia 4 a inelului nicotinamidic, celălalt hidrogen este eliminat de pe substrat ca ion liber H^+.

3. Rotenona (substanţă extrem de toxică extrasă din plante şi utilizată ca insecticid) şi amitalul (medicament din clasa barbituricelor) blochează transportul de electroni pe porţiunea dintre NADH şi ubichinonă (complexul NADH-CoQ-reductaza) şi astfel împiedică generarea gradientului de protoni în primul punct de fosforilare oxidativă. Restabilirea fluxului de electroni şi sintezei de ATP se poate efectua prin adăugare de succinat la mitocondrii, deoarece inhibitorii indicaţi nu influenţează asupra oxidării succinatului, întrucît electronii acestui substrat se includ în lanţul respirator prin intermediul FAD-lui la nivelul CoQ, deci după locul de blocare de către rotenonă şi amital.

4. 2,4-Dinitrofenolul este un agent de decuplare a fosforilării oxidative. În prezenţa lui transferul de electroni de la NADH la O_2 decurge normal însă nu are loc formarea ATP-lui de către ATP-sintetaza mitocondrială, întrucît dispare forţa protonmotrică care asigură transportul protonilor prin membrana mitocondrială internă.

Antibioticul oligomicina face parte din clasa inhibitorilor fosforilării oxidative. El inhibă ATP-sintetaza, deci, împiedică atît stimularea consumului de oxigen de către ADP, cît şi fosforilarea ADP la ATP şi nu inhibă direct nici unul dintre transportatorii de electroni ai lanţului respirator.

5. Restabilirea transportului de electroni şi sintezei de ATP se poate efectua prin adăugarea la mitocondrii a unui substrat de oxidare, care evită includerea electronilor în lanţul respirator la nivelul CoQ prin intermediul FAD-lui, deci a unui substrat de oxidare care include electronii la nivelul NAD^+-lui (de exemplu, malat, izocitrat, glutamat, 3-hidroacil-CoA, piruvat sau exces de succinat).

Pentru restabilirea numai a transportului de electroni la mitocondrii se adaugă unul din substratele sus-menţionate şi un agent decuplat, de exemplu 2,4-dinitrofenol care permite transportul electronilor, dar blochează fosforilarea ADP la ATP.

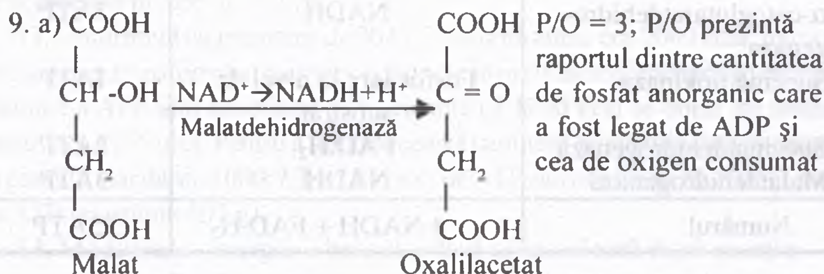
6. Antimicina A (antibiotic toxic sintetizat de o tulpină de Streptomyces) blochează transportul electronilor în lanţul respirator la nivelul complexului

III, deci blochează transportul electronilor de la ubichinonă la citocromul c. Astfel, transportorii de electroni pînă la blocaj se vor găsi în forma redusă - NADH, FMN.H_2, FAD.H_2, CoQ.H_2, cyt.b Fe^{2+}, iar transportorii de după blocaj - cyt.c_1, cyt.c şi cyt.aa_3 - în formă oxidată. Oxidul de carbon inhibă citocromul aa_3 (citocromoxidaza sau complexul IV). Astfel, toţi transportorii de electroni inclusiv şi citocromii c_1 şi c se vor găsi în formă redusă.

7. 2,4-Dinitrofenolul, tiroxina şi acizii graşi prezintă agenţi decuplanţi ai fosforilării oxidative. Decuplarea fosforilării oxidative poate fi utilă din punct de vedere biologic. Decuplarea prezintă o cale de generare a căldurii pentru menţinerea temperaturii corpului la animalele în hibernare, la unele animale nou-născute şi la mamiferele adaptate la frig. Grăsimea brună foarte bogată în mitocondrii este specializată în acest proces de termogeneză. Rolul de decuplanţi în grăsimea brună îl joacă acizii graşi, eliberarea cărora este reglată de către noradrenalină.

8. Sărurile acidului cianhidric (cianurile) blochează procesul de reducere a oxigenului catalizat de citocromoxidază, deoarece sunt inhibitorii puternici ai citocromoxidazei.

9. a)

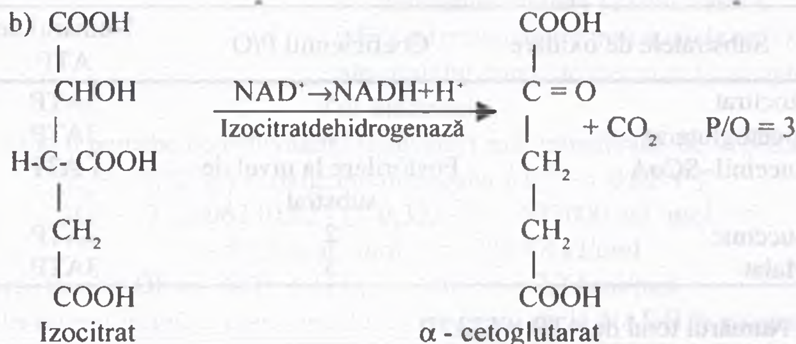


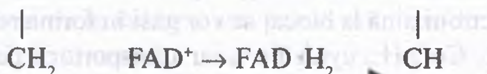
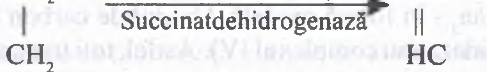
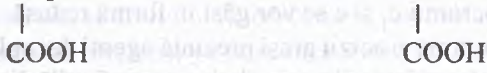
P/O = 3; P/O prezintă raportul dintre cantitatea de fosfat anorganic care a fost legat de ADP şi cea de oxigen consumat



$$NADH + H^+ + 1/2O_2 + 3Pi + 3ADP \rightarrow NAD^+ + 3\ ATP + 4H_2O$$

b)




c) COOH–CH_2–CH_2–COOH (Succinat) $\xrightarrow[\text{Succinatdehidrogenază}]{FAD^+ \rightarrow FAD\,H_2}$ COOH–CH=HC–COOH (Fumarat)

$FAD.H_2 + 1/2O_2 + 2Pi + 2ADP = FAD + 2ATP + 3H_2O$

10. Piruvat → acetil-CoA → ciclul Krebs → lanțul respirator

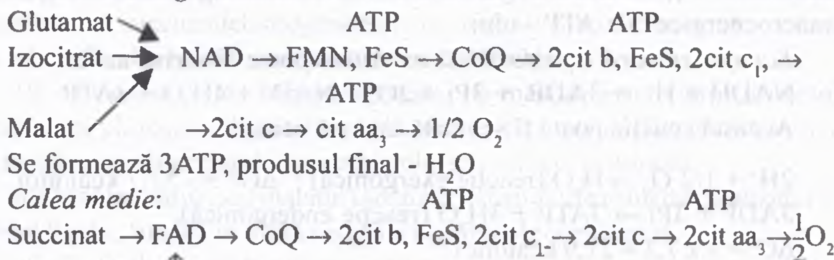
Reacția catalizată de:	Numărul de NADH și $FAD.H_2$	Numărul de ATP
Piruvatdehidrogenaza	NADH	3ATP
Izocitratdehidrogenaza	NADH	3ATP
α-cetoglutaratdehidrogenaza	NADH	3ATP
Succinattiokinaza	Fosforilare la nivel de substrat	1ATP
Succinatdehidrogenaza	$FAD.H_2$	2ATP
Malatdehidrogenaza	NADH	3ATP
Numărul	4 NADH + $FAD.H_2$	15ATP

11.

Substratele de oxidare	Coeficientul P/O	Numărul de ATP
Izocitrat	3	3ATP
α-cetoglutarat	3	3ATP
Succinil~SCoA	Fosforilare la nivel de substrat	1 ATP
Succinat	2	2ATP
Malat	3	3ATP

Numărul total de ATP = 12ATP

12. *Calea lungă:*



Se formează 3ATP, produsul final - H_2O

Calea medie: ATP ATP

Succinat → FAD → CoQ → 2cit b, FeS, 2cit c_1 → 2cit c → 2cit aa_3 → $\frac{1}{2}O_2$

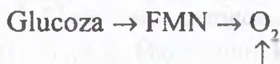
↑

Acid gras-CoA

Se formează 2ATP, produsul final – H_2O

Calea scurtă:

Glucoza → FMN → O_2



Acid gras-CoA → FAD

ATP-ul nu se formează, produsul final - H_2O_2, care la acțiunea catalazei se scindează în apă și oxigen.

13. Omul adult cu greutatea de 70 kg consumă zilnic cca 2000 kcal. Întrucît eficacitatea transformării energiei conținute în produsele alimentare în energia chimică a ATP-ului constituie 50%, rezultă că 1000 kcal se obțin pe seama hidrolizei ATP-ului. Pentru a obține această cantitate de energie sunt necesare în condiții standarde 1000:7,3 = 137 moli de ATP sau cca 62 kg de ATP (1 mol de ATP constituie 507 g).

14. Modificarea energiei libere standard se calculează după ecuația:

$\Delta G^0 = - nF\ \Delta E'_o$, unde: n - numărul de electroni transferați;
F - constanta Faraday (23062 cal/V);
$\Delta E_o'$ - diferența dintre potențialele redox ale cuplului donor de electroni și acceptor de electroni.

Cînd o pereche de echivalenți reducători este transferată de la NADH (E_o'= - 0,32 V) la oxigenul molecular (E_o' = + 0,82 V)

$$\Delta G^0 = -2 \cdot 23062\ [0{,}82 - (-0{,}322)] = -527000\ cal \cdot mol^{-1} =$$
$$= -52{,}7\ kcal \cdot mol^{-1} = -238{,}48\ kJ/mol$$



15. Pi + ADP ↔ ATP + H_2O ; $\Delta G^0 = + 7{,}3$ kcal/mol

În timpul migrării unei perechi de electroni de la NADH la oxigenul

molecular o parte din energia electronilor este înmagazinată în legăturile macroenergice ale ATP - ului.

Ecuaţia sumară a fosforilării oxidative poate fi scrisă astfel:



$NADH + H^+ + 3ADP + 3Pi + 2O_2 = NAD^+ + 4H_2O + 3ATP$

Această ecuaţie poate fi scindată în două ecuaţii:



$2H^+ + 1/2\ O_2 \rightarrow H_2O$ (reacţie exergonică) ; $\Delta G^0 = -52,7$ kcal/mol



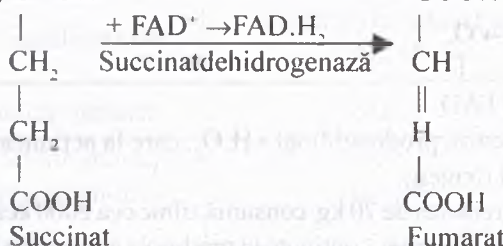
$3ADP + 3Pi \rightarrow 3ATP + 3H_2O$ (reacţie endergonică);

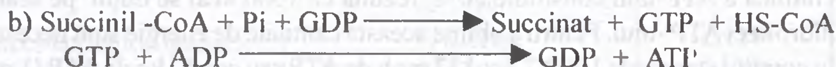


$\Delta G^0 = 3 \times 7,3 = 21,9$ kcal/mol

Deci, *randamentul fosforilării oxidative* va fi: $\frac{21,9 \times 100}{52,7} = 40\%$

16. a)





b) Succinil -CoA + Pi + GDP ⟶ Succinat + GTP + HS-CoA

GTP + ADP ⟶ GDP + ATP

Formarea de ATP prin fosforilarea ADP-ului cu un fosfat organic poartă numele de fosforilare la nivel de substrat pentru a nu fi confundată cu fosforilarea oxidativă legată de lanţul respirator.

17. Malonatul este inhibitorul competitiv al succinatdehidrogenazei, deoarece este analogul structural al succinatului:



a) Succinat + FAD^+ $\xrightarrow{\text{succinatdehidrogenază}}$ Fumarat + $FADH_2$

Reacţia este blocată şi se acumulează succinatul.

b) Succinatul se acumulează din cauza inhibiţiei competitive a succinatdehidrogenazei (structura succinatului - vezi problema 16.).

c) Consumul de oxigen se întrerupe, deoarece se blochează ciclul Krebs care este furnizor de hidrogen sub formă de NADH şi $FAD{\cdot}H_2$ pentru lanţul respirator;

d) Inhibiţia succinatdehidrogenazei poate fi înlăturată prin adăugarea substratului succinatdehidrogenazei (succinat) sau altei substanţe de oxidare a ciclului Krebs (malat, izocitrat, α - cetoglutarat).

18. a) Consumul de oxigen serveşte ca măsură a activităţii primelor două etape ale respiraţiei celulare - glicolizei şi ciclului acizilor tricarboxilici. Adăugarea oxalilacetatului sau malatului stimulează respiraţia.

b) Oxalilacetatul (sau malatul) adăugat îndeplineşte rolul de catalizator în ciclul Krebs, fiindcă în ultima etapă a ciclului el regenerează.

19. Fosforilarea oxidativă necesită:

1. Integritatea membranei interne mitocondriale. Deteriorarea membranei (rupturi, fisuri) determină disfuncţia dintre respiraţie şi sinteza de ATP (transportul de electroni decurge normal dar nu are loc sinteza de ATP).

2. Membrana mitocondrială internă este impermeabilă pentru ionii H^+, OH^-, K^+, Cl^-. Dacă membrana devine permiabilă pentru aceşti ioni, atunci fosforilarea oxidativă nu are loc (agenţii decuplanţi măresc considerabil permeabilitatea membranei interne pentru ionii H^+ şi este anulat gradientul de protoni ai membranei interne).

20.1. Energia eliberată în reacţiile de oxidare din lanţul respirator al mitocondriilor ţesutului adipos brun se degajă în mediu sub formă de căldură pentru menţinerea temperaturii corpului la nou-născuţi.

2. Mecanismele care explică micşorarea cîtului P/O:

- decuplarea fosforilării oxidative;
- consum ridicat de ATP;
- mai puţin de 3 locuri de fosforilare.

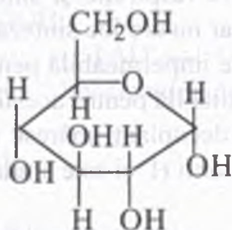
CAPITOLUL IV

Chimia şi metabolismul glucidelor

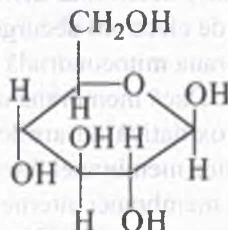
TEMA 13

Chimia şi digestia glucidelor. Metabolismul glicogenului (sinteza, mobilizarea, reglarea). Reacţii de identificare a monozelor în lichidele şi preparatele biologice

1. Anomerii indică configuraţia sterică a hidroxilului semiacetalic sau glicozidic şi sunt denumiţi anomerul α şi anomerul β:

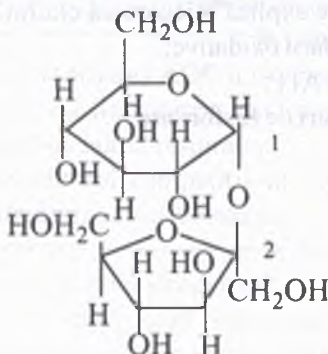


α - glucopiranoza



β - glucopiranoza

Zaharoza (α-glucopiranozid-β-fructofuranozid) are următoarea formulă:



La formarea legăturilor glicozidice 1,2 participă cele două grupări glicozidice din glucoză şi fructoză, din care cauză zaharoza nu prezintă fenomenul de anomerie.

2. Celoluza este constituită din resturi de D-glucoză reunite prin legături

(1→4) 0-glicozidice, în această privinţă celuloza se aseamănă cu amiloza şi segmentele liniare ale glicogenului. Însă între aceste polizaharide există o diferenţă foarte importantă: în celuloză legăturile 1→4 au configuraţia β, iar în amiloză, amilopectină şi glicogen - configuraţia α (1→4). Legăturile glicogenului şi amidonului sunt uşor hidrolizate de către α-amilază, iar legăturile β (1→4) din molecula celulozei nu sunt scindate de către α - amilază (specificitate stereochimică a amilazei).

Datorită particularităţilor geometrice ale legăturilor α (1→4), segmentele liniare din moleculele de glicogen şi amidon tind să formeze conformaţie în formă de helix ce contribuie la formarea de granule compacte. În ce priveşte celuloza, din cauza configuraţiei β a legăturilor glicozidice lanţurile polizaharidice ale celulozei sunt întinse şi formează fibrile lungi insolubile.

3. A şi B sunt fosfotrioze şi anume A este dihidroxiacetonfosfatul, iar B - gliceraldehid-3-fosfatul. A este o cetotrioză fosforilată, iar B - o aldotrioză fosforilată şi fac parte din clasa monozaharidelor care sunt alcooli-aldehide (aldoze) sau alcooli-cetone (cetoze), deci monozaharidele sunt combinaţii cu funcţii mixte.

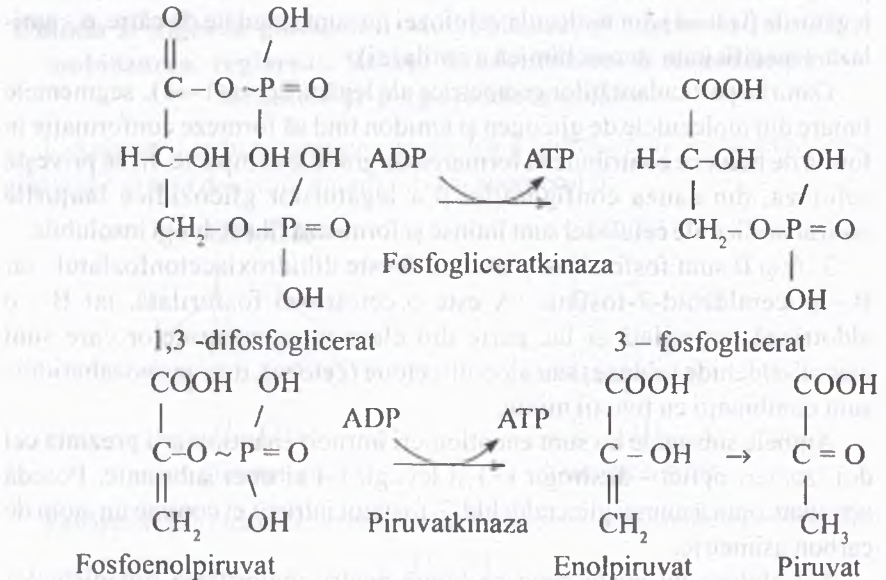
Ambele substanţe nu sunt enantiomeri întrucît enantiomerii prezintă cei doi izomeri optici - dextrogir (+) şi levogir (-) ai unei substanţe. Posedă activitate optică numai gliceraldehid-3-fosfatul întrucît el conţine un atom de carbon asimetric.

4. Celuloza nu poate servi ca hrană pentru majoritatea organismelor superioare întrucît în tractul lor digestiv lipseşte enzima celulaza, capabilă să hidrolizeze celuloza. Celuloza este sintetizată de unele microorganisme. Printre vertebrate numai bovinele şi alte rumegătoare (oile, căprile ş.a.) pot utiliza celuloza în calitate de substanţă nutritivă întrucît microorganismele rumenului secretă celulază, care scindează celuloza pînă la D-glucoză din care se formează acizi graşi, CO_2 şi CH_4.

TEMA 14

Glicoliza. Reglarea. Soarta piruvatului în diferite condiţii. Fermentaţia alcoolică. Gluconeogeneza: mecanismul, reglarea

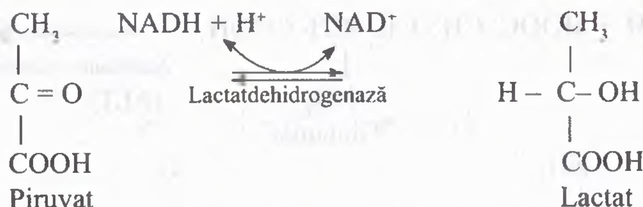
1.



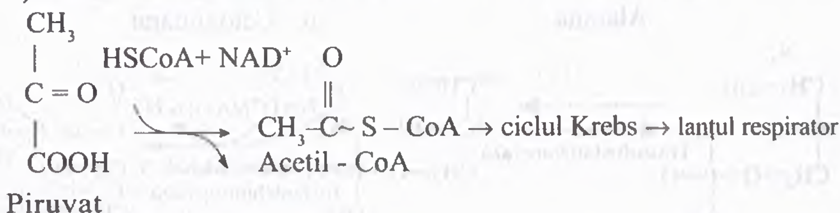
2.

Clasa de enzime	*Enzimele glicolitice*
Oxidoreductaze	Lactatdehidrogenaza Gliceraldehid-3-fosfat-dehidrogenaza (NAD^+- dependentă)
Liaze	Fructozodifosfataldolaza
Transferaze	Glucokinaza Hexokinaza Fosfofructokinaza Fosfogliceratkinaza Piruvatkinaza

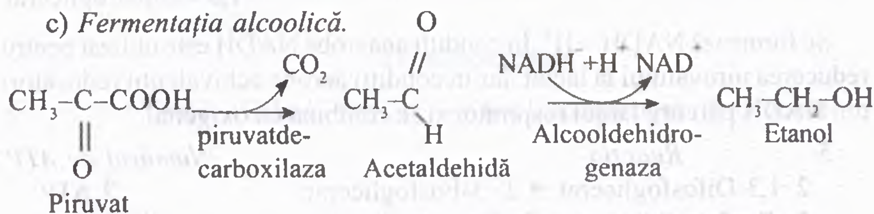
3. a) *Glicoliza anaerobă*



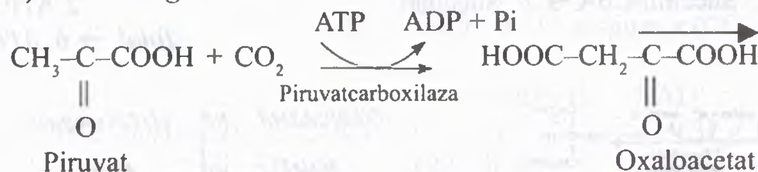
b) *Glicoliza aerobă.*

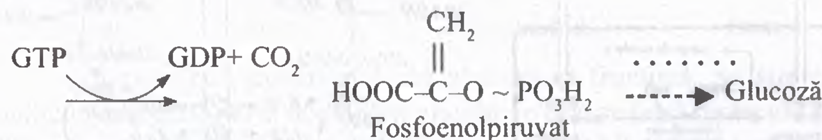


c) *Fermentaţia alcoolică.*



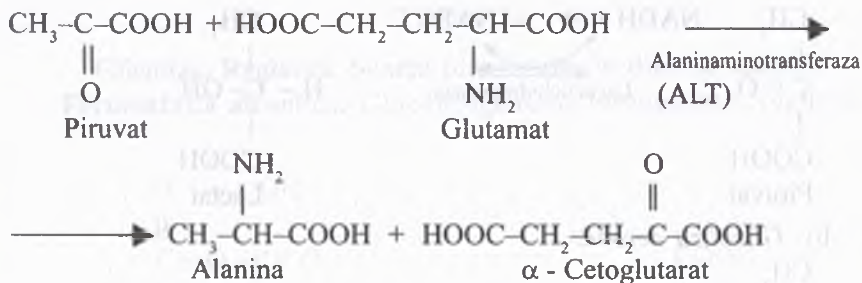
d) *Gluconeogeneza.*



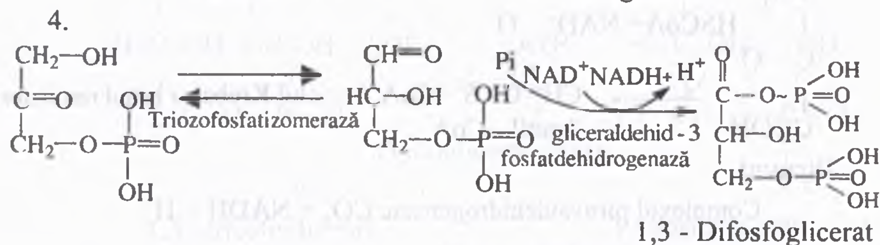


Fosfoenolpiruvatcarboxikinaza

e) *Participă la procesele de transaminare.*



4.

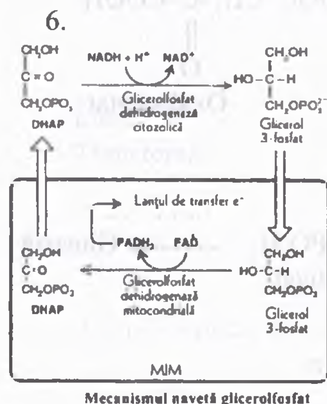


Se formează NADH + H^+. În condiţii anaerobe NADH este utilizat pentru reducerea piruvatului la lactat, iar în condiţii aerobe echivalenţii reducători din NADH parcurg lanţul respirator şi se combină cu oxigenul.

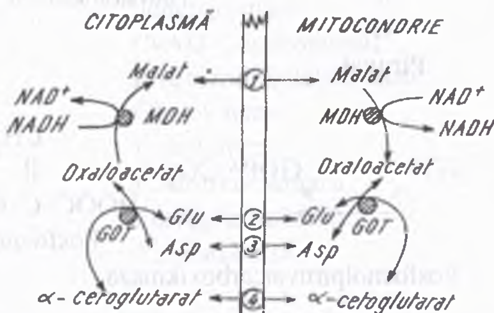
5.

Reacţia	*Numărul de ATP*
2 · 1,3-Difosfoglicerat → 2 · 3-Fosfoglicerat	2 ATP
2 · Fosfoenolpiruvat → 2 · Piruvat	2 ATP
2 · Succinil-CoA → 2 · Succinat	2 ATP
	Total → 6 ATP

6.

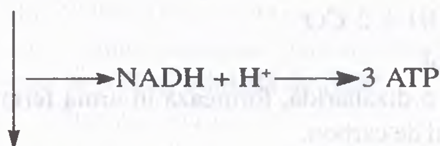


Mecanismul navetă glicerolfosfat

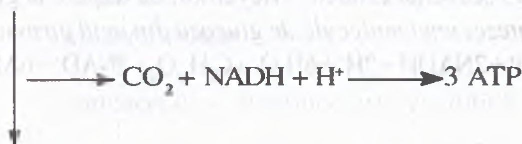


Transferul bidirecţional "malat-aspartat"

7. Lactat



Piruvat



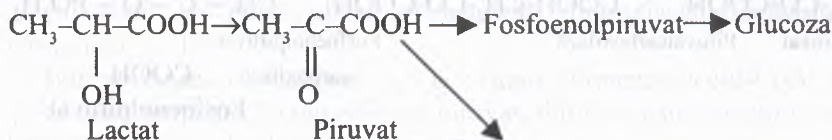
Acetil-CoA

↓

Ciclul Krebs cuplat cu lanțul respirator → 12 ATP (CO_2 + H_2O)

Total – 18 ATP

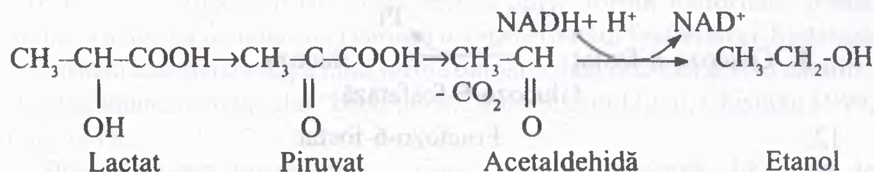
8. Gluconeogeneza



Acetil-CoA → Ciclul Krebs și lanțul

+ CO_2 + NADH + H^+ respirator (CO_2+H_2O)

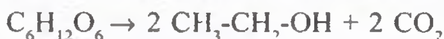
9.



Lactat Piruvat Acetaldehidă Etanol

10. Zaharoza este constituită din glucoză și fructoză. Se știe că beneficiul energetic net al degradării glicolitice este de două molecule de ATP per moleculă de glucoză. Două molecule de ATP se formează și la degradarea fructozei. Deci, beneficiul net pentru zaharoză este de 4 molecule de ATP.

Ecuaţia sumară a fermentaţiei alcoolice este:



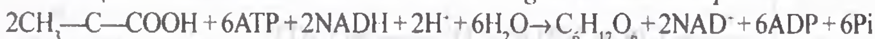
$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3\text{-}CH_2\text{-}OH + 2\ CO_2$$

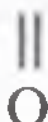
Glucoză Etanol

Reiese că zaharoza, fiind o dizaharidă, formează în urma fermentaţiei alcoolice 4 molecule de dioxid de carbon.

11. Lanţul de reacţii ale căii gluconeogenetice începe cu acidul piruvic, care parcurgînd în sens invers secvenţa Emden - Meyerhof, dă naştere la glucoză.

Ecuaţia sumară a sintezei unei molecule de glucoză din acid piruvic:

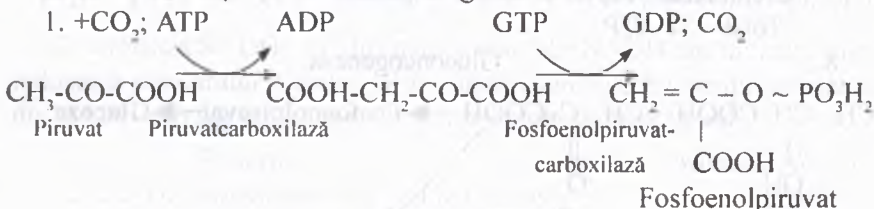


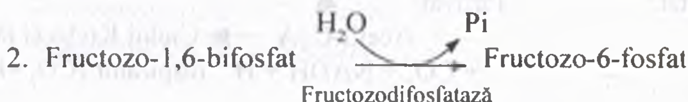


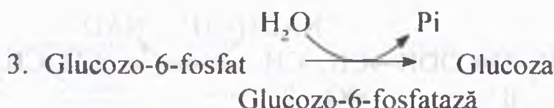
$$2CH_3\text{—}\underset{\underset{O}{\|}}{C}\text{—}COOH + 6ATP + 2NADH + 2H^+ + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 2NAD^+ + 6ADP + 6Pi$$

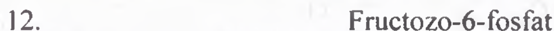
Această reacţie arată că în procesul de gluconeogeneză se consumă şase legături macroergice.

Inversarea reacţiilor ireversibile ale glicolizei anaerobe.

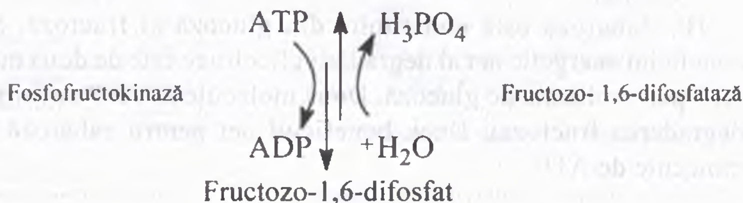








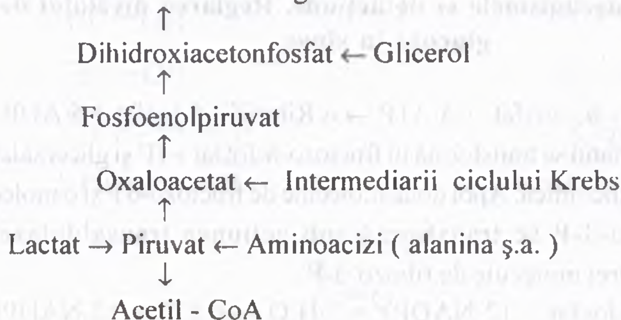
12.



Fosfofructokinaza este o enzimă alosterică sensibilă la gradul de încărcare a sistemului ADP-ATP, activată de ADP şi inhibată de ATP.

Fructozo-1,6-difosfataza este o enzimă-cheie în metabolismul glicogenului; este activată de ATP şi inhibată de ADP.

13.



Calea gluconeogenetică este în principiu o inversare a secvenţei glicolitice. Din schemă se observă că substanţele glucoformatoare vor fi succinatul (intermediar al ciclului Krebs, care se include în lanţul gluconeogenetic la nivelul oxalil - acetatului), glicerolul (la nivelul dihidroxiacetonfosfatului) şi piruvatului.

Butiratul este un acid gras care la oxidare formează acetil-CoA, însă acetil-CoA nu poate fi convertită în piruvat, din care cauză acetil-CoA şi butiratul nu sunt substanţe glucoformatoare.

14. Punctul de control principal al glicogenogenezei este glicogensintetaza, enzima responsabilă de formarea legăturilor α - (1 → 4) glicozidice. Această enzimă, ca şi glicogenfosforilaza, există într-o formă fosforilată şi una nefosforilată, dar activitatea ei variază invers activităţii fosforilazei. Sintetaza fosforilată este inactivă, pe cînd forma defosforilată este cea activă catalitic (vezi schema din manualul "Biochimie", autor Leonid Lîsîi, Chişinău 1999, pag. 177).

Prin acest mecanism acelaşi stimul, care declanşează eliberarea de adrenalină şi de glucagon prin creşterea concentraţiei AMP-ciclic, determină atît inhibarea glicogensintetazei, cît şi activarea glicogenfosforilazei.

15. La transformarea unui mol de glucozo - 6 - fosfat în glicogen se consumă un mol de ATP; aceasta constituie 2,6 % din cantitatea totală de ATP care se formează la degradarea completă a glucozo-6-fosfatului (39 moli de ATP), deci eficienţa conservării energiei constituie 97,4 %.

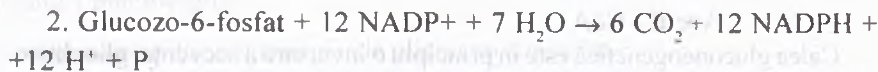
TEMA 15

Calea pentozofosfat de degradare a glucozei. Includerea altor monozaharide (fructoza, galactoza) în secvenţa glicolitică. Reglarea şi patologia metabolismului glucidic. Diabetul zaharat. Insulina şi mecanismele ei de acţiune. Reglarea nivelului de glucoză în sînge



1. 5 Glucozo - 6 - fosfat + 5 ATP → 6 Ribozo - 5-fosfat + 5 ADP

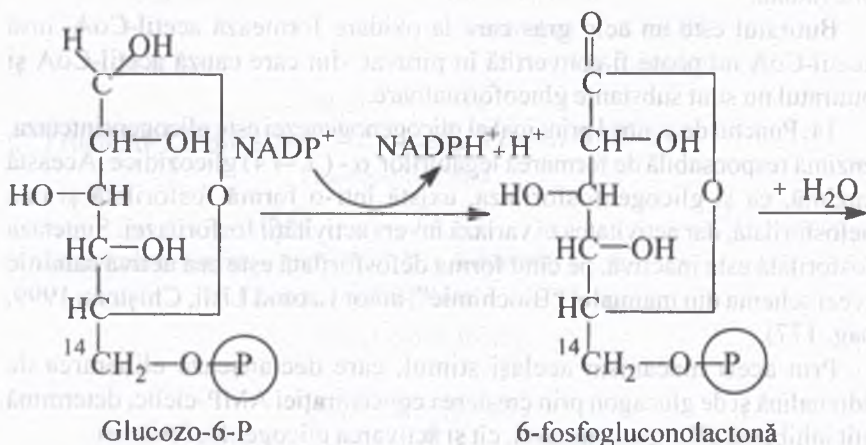
Glucozo-6-fosfatul se transformă în fructozo-6-fosfat + H^+ şi gliceraldehid-3-fosfat pe calea glicolitică. Apoi două molecule de fructozo-6 P şi o moleculă de gliceraldehid-3-P se transformă sub acţiunea transaldolazei şi transcetolazei în trei molecule de ribozo-5-P .



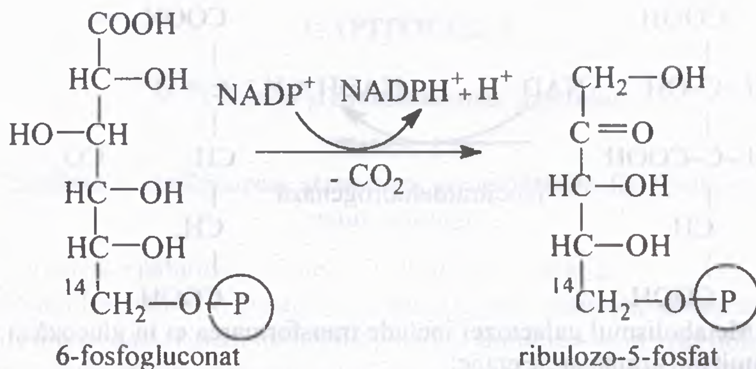
2. Glucozo-6-fosfat + 12 NADP+ + 7 H_2O → 6 CO_2 + 12 NADPH + +12 H^+ + P_i

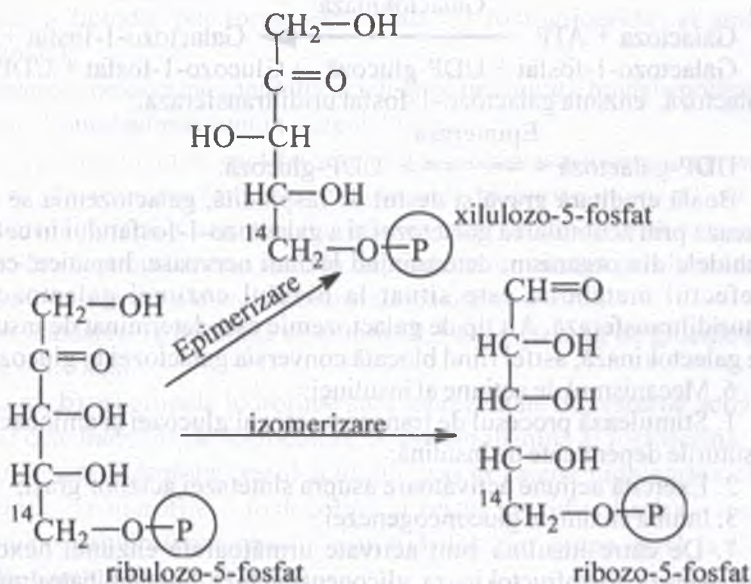
Astfel, glucozo-6-P poate fi oxidat complet pînă la CO_2 cu generarea concomitentă de NADPH.

3.



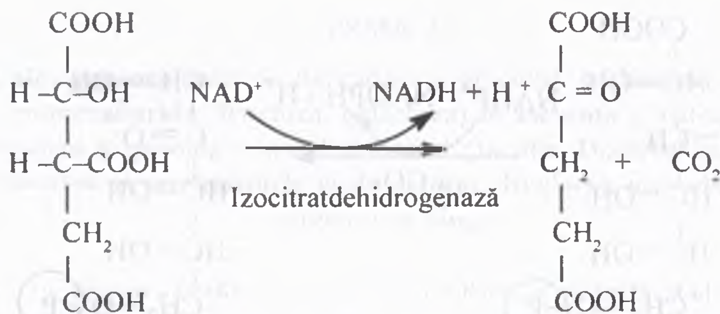
Glucozo-6-P 6-fosfogluconolactonă





Din etapa oxidativă a căii pentozofosfat se observă că izotopul radioactiv C^{14} de la atomul C-6 al glucozei apare în pentozofosfaţi.

4. Reacţia ciclului Krebs, analoagă cu reacţia oxidării 6-fosfogluconatului, este reacţia de oxidare a acidului izocitric la acid α- cetoglutaric.



5. Metabolismul galactozei include transformarea ei în glucoză şi este constituit din următoarele etape:

Galactoza + ATP $\xrightarrow{\text{Galactokinază}}$ Galactozo-1-fosfat + ADP

Galactozo-1-fosfat + UDP-glucoză → Glucozo-1-fosfat + UDP-galactoză, enzima galactozo-1-fosfat uridiltransferaza.

Epimeraza

UDP-galactoză < ====== > UDP-glucoză.

Boală ereditară gravă şi destul de răspîndită, galactozemia se caracterizează prin acumularea galactozei şi a galactozo-1-fosfatului în celule şi în lichidele din organism, determinînd leziuni nervoase, hepatice, cataractă. Defectul metabolic este situat la nivelul enzimei galactozo-1-fosfaturidiltransferază. Alt tip de galactozemie este determinat de insuficienţa de galactokinază, astfel fiind blocată conversia galactozei în glucoză.

6. Mecanismul de acţiune al insulinei:

1. Stimulează procesul de transport activ al glucozei şi aminoacizilor în ţesuturile dependente de insulină;

2. Exercită acţiune activatoare asupra sintetazei acizilor graşi;

3. Inhibă enzimele gluconeogenezei.

7. De către insulină sunt activate următoarele enzime: hexokinaza, glucokinaza, fosfofructokinaza, glicogensintetaza. Sunt inhibate următoarele enzime: glicogenfosforilaza, piruvatcarboxilaza.

8. Acţiune hiperglicemiantă posedă următorii hormoni: glucagonul, adrenalina, adrenocorticotropina şi hidrocortizonul.

9. Eroarea genetică la bolnavii cu afecţiunea von Gierke constă în sinteza defectuoasă a glucozo-6-fosfatazei. Absenţa acestei enzime conduce la:

1) hipoglicemie;

2) acumularea în ficat şi în rinichi a unor cantităţi excesive de glicogen;

3) creşterea nivelului de acid lactic în sînge.

CAPITOLUL V

Chimia şi metabolismul lipidelor

TEMA 17

Lipidele – clasificarea, structura, proprietăţile fizico-chimice, rolul biologic

1. a) oleic > palmitic > linoleic > palmitoleic > stearic.

b) acidul palmitic şi stearic – acizii graşi saturaţi, acizii oleic şi palmitoleic – acizi graşi monoenici, acidul linoleic – acid gras polienic;

c) la temperatura corpului, acizii graşi saturaţi sunt în stare solidă, iar cei nesaturaţi – lichidă; pot forma esteri (acil şi fosfogliceride) şi amide (sfingolipide).

d) deoarece predomină cantitativ acizii graşi nesaturaţi, lipidele policomponente în ţesutul adipos sunt în stare lichidă.

2. În organismul uman cantitatea lipidelor protoplasmatice este aproape constantă, deoarece ele formează membranele biologice, numărul cărora este practic invariabil. Cantitatea lipidelor de rezervă, concentrate în ţesutul adipos (98%), variază foarte mult în dependenţă de modul de alimentare, necesităţile energetice ale individului şi starea organismului.

3. La scindarea 1 g de lipide se elimină 9,3 kcal, iar a 1 g de glucide sau proteine – 4,1 kcal.

4. La a), b), c) grupele hidrofobe sunt reprezentate de resturile acizilor graşi, iar cele hidrofile de fosfocolină, fosfoetanolamină şi fosfoserină. La d), e) şi f) sunt hidrofobe restul acidului gras şi catena hidrocarburică a sfingozinei, iar hidrofile – fosfocolina şi restul glucidic. La h) – inelul ciclopentan-perhidrofenantrenului este hidrifob, iar grupa –OH la C_3 – hidrofilă. Sarcină posedă a), b), d).

5. a).

6. a) membranele lizozomilor; b) sunt foarte sensibile la stresurile oxidative, structura şi funcţiile fiind afectate mai uşor decît ale membranelor clasice, formate din straturi duble de lipide.

7. Membranele celulelor canceroase sunt mai lichide decît ale celulelor normale.

TEMA 18

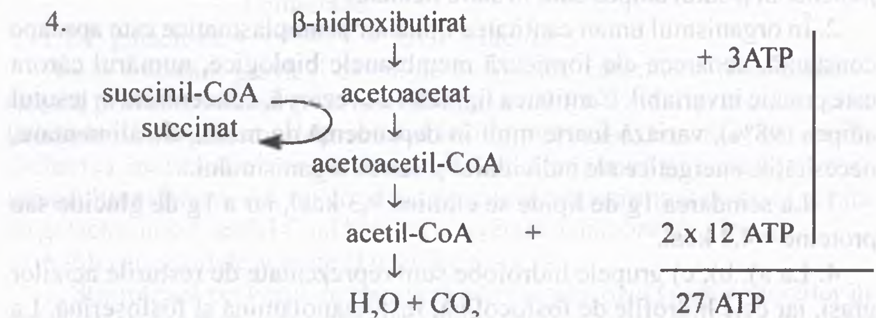
Digestia şi absorbţia lipidelor în tractul gastrointestinal. Catabolismul tisular al lipidelor

1. La oxidarea acidului capronic (C=6) se formează 45 mol de ATP, iar a glucozei (C=6) 36 sau 38 mol de ATP.

2. Sunt analoage următoarele succesiuni: a) b-oxidarea – reacţiile catalizate de acil-CoA-dehidrogenaza → enoil-CoA-hidrataza → β-hidroxiacil-CoA-dehidrogenaza; b) ciclul Krebs - reacţiile catalizate de succinat-dehidrogenază → fumarat hidrataza → malat dehidrogenaza.

3. Palmitooleomargarianatul este un triacilglicerid ce se scindează până la glicerol, acid palmitic (C_{16}), acid oleic ($C_{18:1\ cis}$-Ä[9]) şi acid margarianic (C_{17}). Oxidarea completă a glicerolului furnizează 22 ATP-uri; a acidului palmitic –130 ATP-uri; a acidului oleic–145 ATP-uri, a acidului margarianic – 124 ATP-uri. În total rezultă 421 molecule de ATP.

4.



5. a) glicerol + 2NAD⁺ + ADP + H_3PO_4 → piruvat + ATP + 2NADH + $+H^+$ $+H_2O$

b) glicerolkinaza; glicerolfosfat dehidrogenaza.

6. Insuficienţa glucidelor încetineşte ciclul Krebs, deci oxidarea lipidelor va fi incompletă, acumulîndu-se cantităţi mari de acetil-CoA. Cantitatea de ATP formată se va micşora semnificativ.

7. a) acidul linolic ($C_{18:2\ cis}$ Ä[9], Ä[12]) şi acidul linoleic ($C_{18c\ cis}$ Ä[9], Ä[12], Ä[15]).

b) uleiurile vegetale.

8. Creşte degradarea triacilgliceridelor.

9. d).

10. d).

TEMA 19

Biosinteza lipidelor

1.

Oxidarea acizilor graşi	Biosinteza acizilor graşi
a) matricea mitocondrială;	a) citoplasmă;
b) sistemul naveta carnitinic;	b) sistemul naveta citrat;
c) FAD^{+}; NAD^{+};	c) NADPH;
d) funcţional.	d) funcţional-structural.

2. a) ciclul pentozofosfaţilor → reacţiile catalizate de glucozo-6 fosfat → →dehidrogenaza şi 6-fosfogluconat dehidrogenaza;

b) sistemul naveta citrat → reacţia catalizată de malic-enzimă.

3. a) vezi L.Lîsâi "Biochimie", pag. 241.

b) precursorul eicosanoizilor.

4. a) Produsul intermediar al oxidării etanolului în organismul omului este acetil-CoA, precursorul biosintezei acizilor graşi. Totodată, decarboxilarea oxidativă a piruvatului este ireversibilă, deci din acetil-CoA nu se formează substrate gluconeogenetice.

b) Este accelerată biosinteza TAG.

c) etanol → aldehida acetică → acetil-CoA → acizi graşi → TAG.

5. Deoarece colesterolul alimentar este un reglator important al biosintezei colesterolului, aportul extern limitează sinteza endogenă. Deci, la vegetarieni se sintetizează în organism mai mult colesterol decât la persoanele ce consumă şi produse de origine animală.

6. a), b), c), d).

7. c).

8. a) CDP-diacilgliceridul;

b) CDP-etanolamina;

c) acil-CoA;

d) CDP-colina;

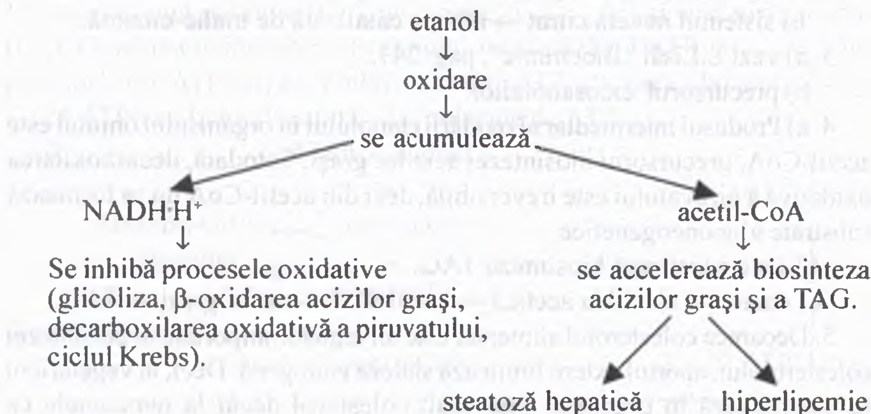
e) UDP-glucoza sau UDP-galactoza.

9. a), b), d).

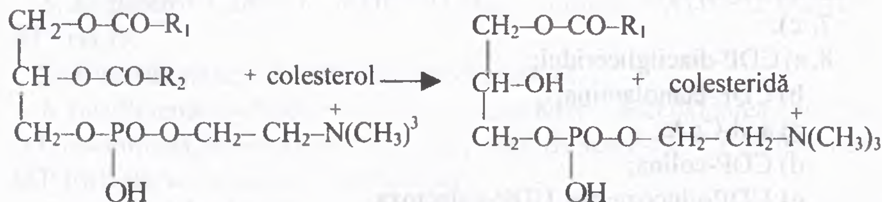
TEMA 20

Reglarea şi patologia metabolismului lipidic

1. a), c), e).
2. e).
3. a) Neimann-Pick → sfingomielinaza → sfingomieline.
b) Tay-Sachs → hexozaminidaza A → gangliozidul GM_2.
c) Krable → galactocerebrozidaza → galactocerebrozide.
d) Gaucher → glucozidaza → glucocerebrozide.
e) Leucodistrofia metacromatică → sulfatidaza → sulfatide.
f) Gangliozidoza GM_1 → galactozidaza → gangliozidul GM_1.
4.



5. a) lipoproteinele cu densitate mare (HDL, α-lipoproteidele).
b) lecitin-colesterol-acil-transferaza (LCAT).



6. Hemoragiile ce apar în hipovitaminozele K sunt neregulate şi abundente. Ele sunt condiţionate de dereglările biosintezei factorilor coagulării II, V, VII şi X în ficat. În hipovitaminoza C hemoragiile sunt punctiforme şi apar din cauza creşterii permeabilităţii capilarelor, condiţionată de dereglarea biosintezei colagenului (hidroxilarea prolinei şi lizinei).

CAPITOLUL VI
Metabolismul proteinelor şi nucleotidelor

TEMA 21
Metabolismul proteinelor simple. Digestia şi absorbţia proteinelor. Putrefacţia proteinelor în intestin

1. Tripsina prezintă specificitate pentru legăturile peptidice în care sunt implicate grupările carboxil ale aminoacizilor bazici - lizinei şi argininei. Acţiunea hidrolitică a chimotripsinei se manifestă îndeosebi asupra legăturilor peptidice în care sunt implicate grupările carboxil ale fenilalaninei, tirozinei sau triptofanului.

Pepsina prezintă specificitate pentru legăturile peptidice, formate de grupările aminice ale fenilalaninei, tirozinei şi triptofanului.

Carboxipeptidaza A posedă specificitate pentru aminoacizii C-terminali aromatici şi pentru aminoacizii C-terminali bazici. Aminopeptidaza scindează hidrolitic aminoacizii N-terminali.

2. Proteinele de origine animală (cazeina laptelui, ovalbumina din ouă) au valoare biologică înaltă, deoarece ele conţin toţi cei 20 de aminoacizi în proporţii apropiate de compoziţia în aminoacizi a proteinelor tisulare.

Proteinele vegetale (zeina din porumb, glutenina şi gliadina din grîu) au valoare biologică mult mai redusă decît cele animale, întrucît în ele lipsesc unul sau cîţiva aminoacizi esenţiali (de exemplu, proteinele porumbului conţin puţină lizină).

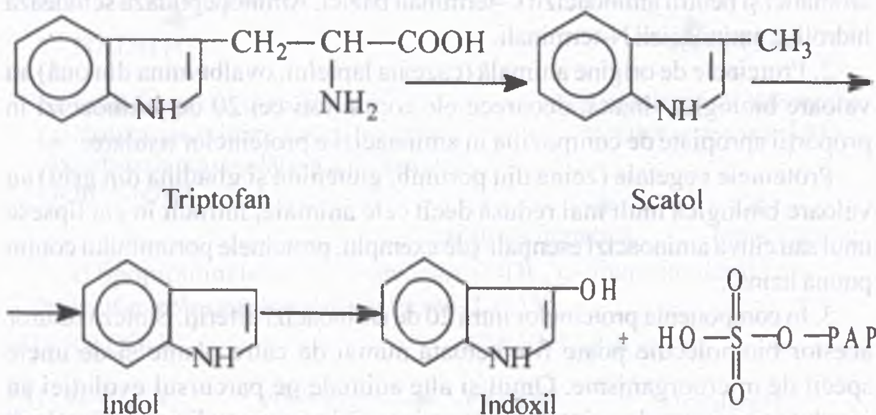
3. În componenţa proteinelor intră 20 de aminoacizi diferiţi. Sinteza tuturor acestor biomolecule poate fi efectuată numai de către plante şi de unele specii de microorganisme. Omul şi alte animale pe parcursul evoluţiei au pierdut capacitatea de a sintetiza opt aminoacizi pe care nu îi pot obţine decît prin aport exogen. Aceştea sunt aminoacizii esenţiali (sau indispensabili): valina, leucina, izoleucina, lizina, metionina, treonina, fenilalanina şi triptofanul. Doi aminoacizi, histidina şi arginina, sunt indispensabili pentru organismele în creştere şi sunt numiţi aminoacizi semiesenţiali. Ceilalţi 10 aminoacizi: alanina, glicina, serina, tirozina, cisteina, prolina, aspartatul, asparagina, glutamatul şi glutamina pot fi obţinuţi prin sinteză şi deci sunt aminoacizi neesenţiali (dispensabili).

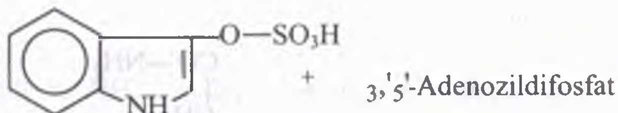
4. Tripsina, chimotripsina, elastaza şi carboxipeptidaza. Aminopeptidaza este elaborată de intestin, iar renina (sau lab-fermentul) - de stomac şi acţiunea ei constă în coagularea laptelui.

5. Tripsina participă la activarea următoarelor proenzime: chimotripsinogenului, proelastazei şi procarboxipeptidazei.

6. Putrefacţia proteinelor prezintă procesul de degradare a aminoacizilor sub influenţa enzimelor microorganismelor din intestinul gros. În urma putrefacţiei se formează produşi toxici (de exemplu, din tirozină se formează crezol şi fenol, din triptofan - scatol şi indol).

Detoxifierea acestor prodişi are loc în ficat prin procesul de conjugare cu acidul sulfuric (forma activă – 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat) şi cu acidul glucuronic (forma activă - acidul UDP-glucuronic) în prezenţa enzimelor specifice arilsulfotransferazei şi respectiv UDP-glucuroniltransferazei şi în rezultat se formează acizi conjugaţi netoxici (de exemplu, fenolsulfat, în doxilsulfat, etc.) care sunt excretaţi din organism cu urina.





Indoxisulfat

7. Indicanul prezintă sarea de potasiu a indoxilsulfatului. Creşterea concentraţiei de indican în sînge şi urină indică o intensificare a procesului de putrefacţie a aminoacizilor în intestin, fenomen întîlnit în ocluzia intestinală.

8. Valoarea biologică a proteinei este determinată de componenţa aminoacidică. Pentru aceasta, proteina este supusă hidrolizei, apoi se determină compoziţia aminoacidă a proteinei şi se compară cu standardul - proteină obţinută din lapte sau ouă.

TEMA 22

Metabolismul intermediar al aminoacizilor în ţesuturi. Produsele finale ale metabolismului azotat

1. a) Ala, Thr, Gly, Ser, Cys



Piruvat



Acetil-CoA → ciclul Krebs



Acetoacetil- CoA



Phe, Tyr, Leu, Lys, Trp

b) Arg, His, Gln, Pro → Glu → α- cetoglutarat → ciclul Krebs

c) Met, Val, Ile → succinil - CoA → ciclul Krebs

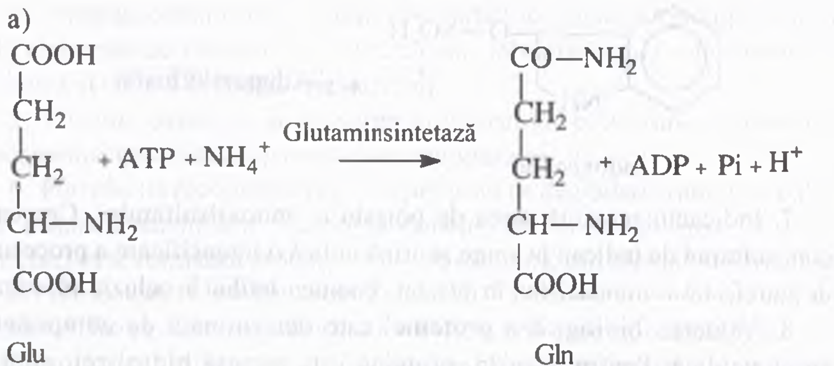
d) Phe, Tyr → fumarat → ciclul Krebs

e) Asp, Asn → oxaloacetat → ciclul Krerbs

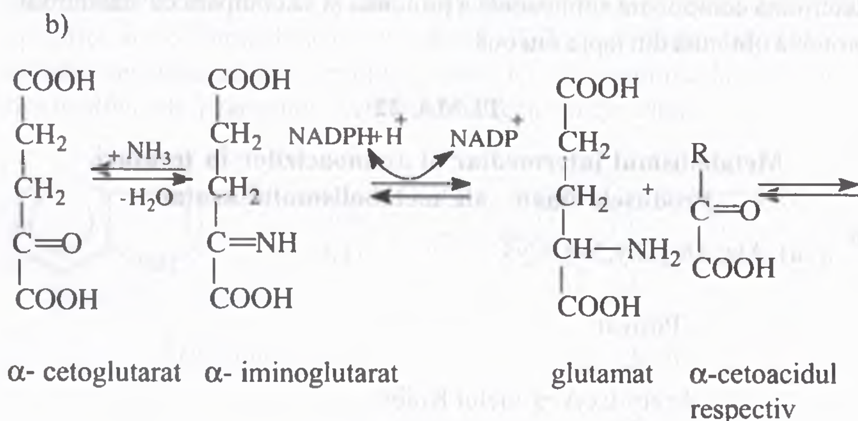
2. a) piruvat; b) α -cetoglutarat; c) oxaloacetat; d) α-cetoglutarat; e) fenilpiruvat; f) hidroxifenilpiruvat.

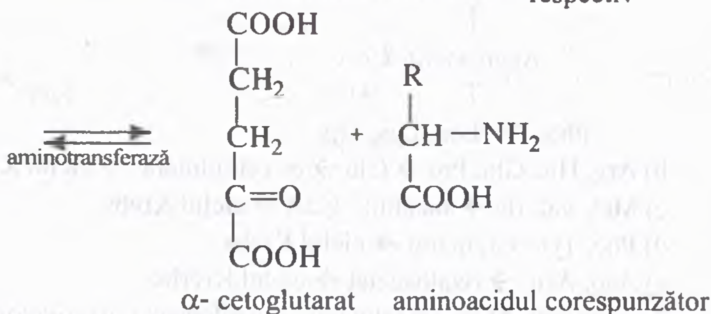
3.

a)

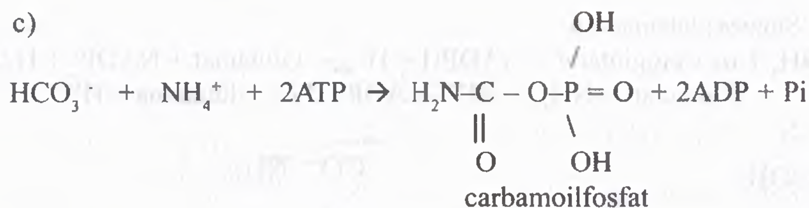

COOH
CH2
CH2
CH—NH2
COOH
+ ATP + NH4+
Glutaminsintetază
CO—NH2
CH2
CH2
CH—NH2
COOH
+ ADP + Pi + H+
Glu
Gln

b)


COOH
CH2
CH2
C=O
COOH
+NH3
-H2O
COOH
CH2
CH2
C=NH
COOH
NADPH+H+
NADP+
COOH
CH2
CH2
CH—NH2
COOH
+
R
C=O
COOH
α- cetoglutarat
α- iminoglutarat
glutamat
α-cetoacidul respectiv


aminotransferază
COOH
CH2
CH2
C=O
COOH
+
R
CH—NH2
COOH
α- cetoglutarat
aminoacidul corespunzător

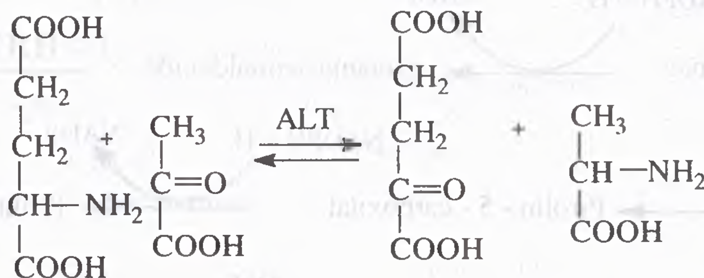
c)



d) Carbamoilfosfatul se include în ciclul ureogenetic şi deci amoniacul care se formează la dezaminarea aminoacizilor se transformă în ficat în uree.

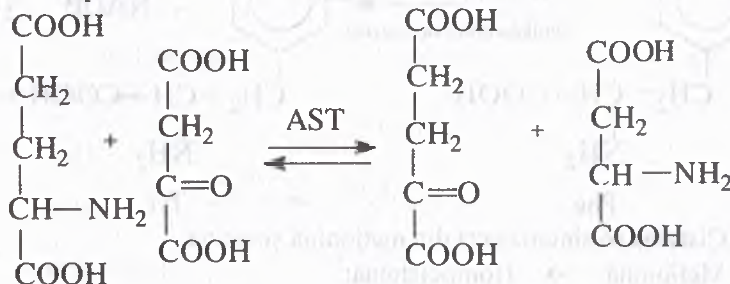
e) În rinichi glutamina este scindată de către glutaminază:
Glutamina + apă = Glutamat + NH_4^+ (săruri de amoniu excretate cu urina)

4. Sinteza alaninei:



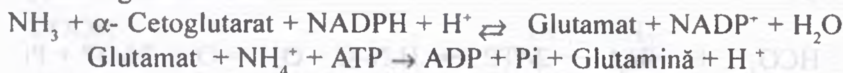
Glu Piruvat α- Cetoglutarat Alanina

Sinteza aspartatului



Glu Oxaloacetat α- Cetoglutarat Aspartat

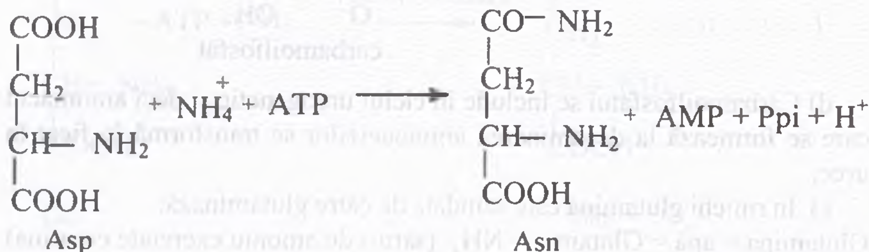
Sinteza glutamatului:



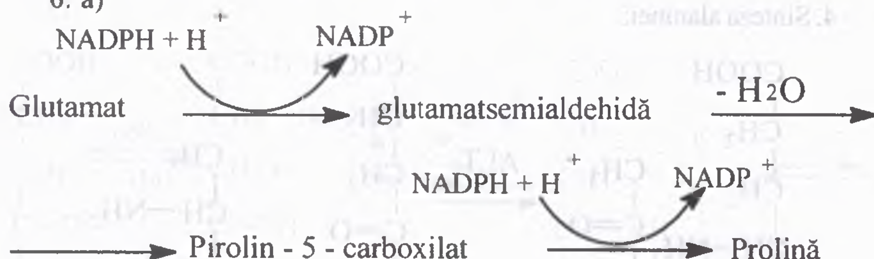
$NH_3 + \alpha\text{- Cetoglutarat} + NADPH + H^+ \rightleftarrows \text{Glutamat} + NADP^+ + H_2O$

$\text{Glutamat} + NH_4^+ + ATP \rightarrow ADP + Pi + \text{Glutamină} + H^+$

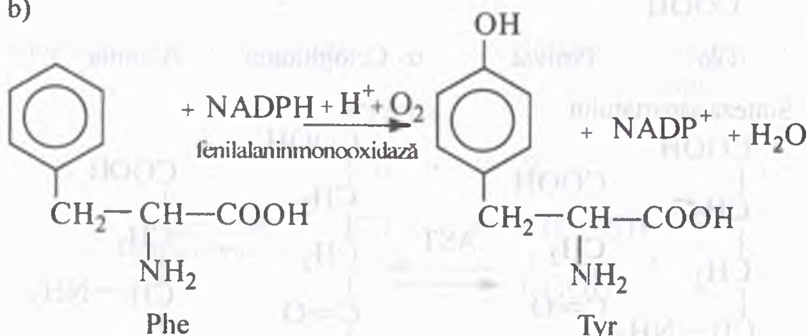
5.



6. a)



b)



c) Cisteina se sintetizează din metionină şi serină.



Metionină → Homocisteină;



$-CH_3$

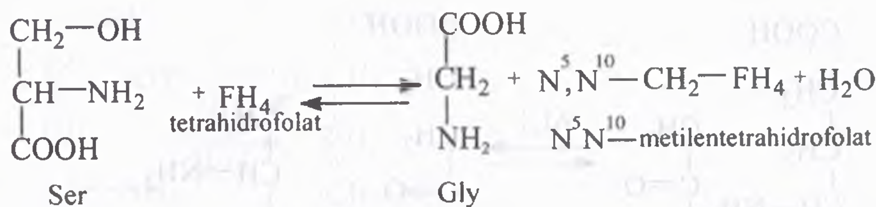


Homocisteină + Serină → Cistationină;



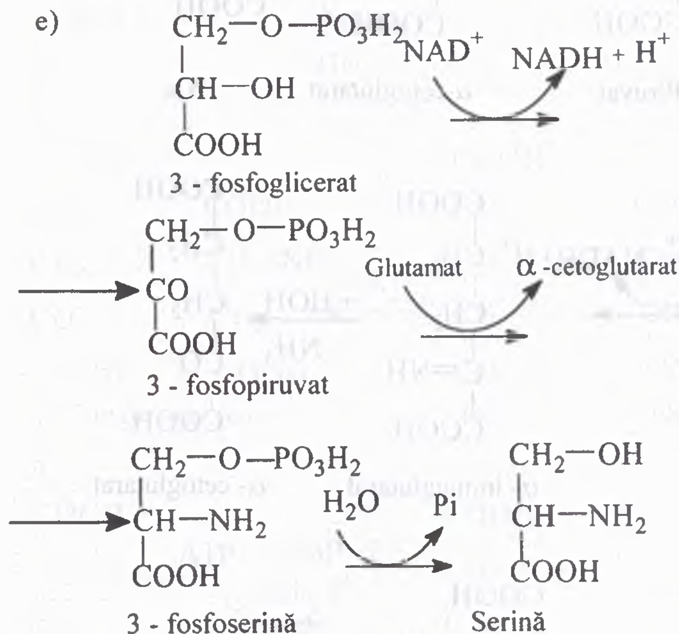
Cistationină + H_2O → Cisteină + Homoserină.

d)



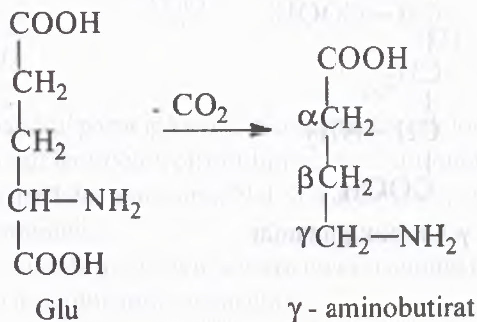
CH_2—OH
CH—NH_2
COOH
Ser
+ FH_4
tetrahidrofolat
COOH
CH_2
NH_2
Gly
+ N^5,N^{10}—CH_2—FH_4 + H_2O
N^5N^{10}—metilentetrahidrofolat

e)



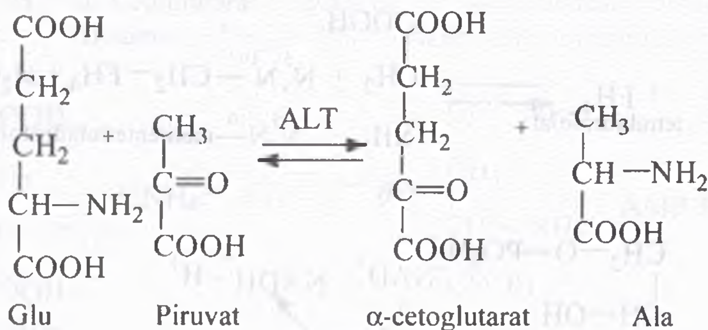
CH_2—O—PO_3H_2
CH—OH
COOH
3 - fosfoglicerat
NAD^+
NADH + H^+
CH_2—O—PO_3H_2
CO
COOH
3 - fosfopiruvat
Glutamat
α -cetoglutarat
CH_2—O—PO_3H_2
CH—NH_2
COOH
3 - fosfoserină
H_2O
Pi
CH_2—OH
CH—NH_2
COOH
Serină

7. a)

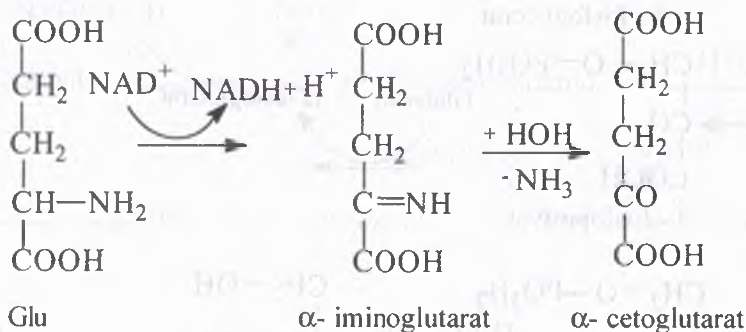


COOH
CH_2
CH_2
CH—NH_2
COOH
Glu
- CO_2
COOH
αCH_2
βCH_2
γCH_2—NH_2
γ - aminobutirat

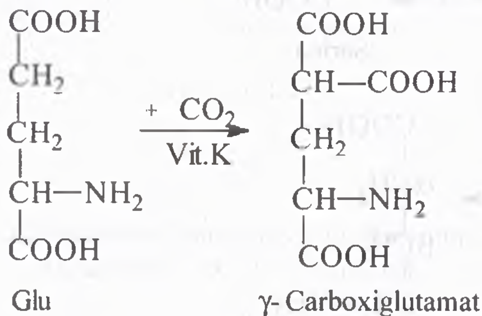
b)


COOH
CH2
CH2
CH—NH2
COOH
CH3
C=O
COOH
ALT
COOH
CH2
CH2
C=O
COOH
CH3
CH—NH2
COOH
Glu
Piruvat
α-cetoglutarat
Ala

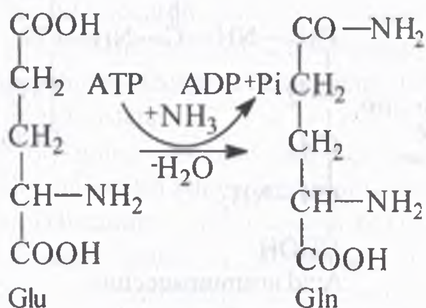
c)


COOH
CH2
CH2
CH—NH2
COOH
NAD+
NADH+H+
COOH
CH2
CH2
C=NH
COOH
+ HOH
- NH3
COOH
CH2
CH2
CO
COOH
Glu
α- iminoglutarat
α- cetoglutarat

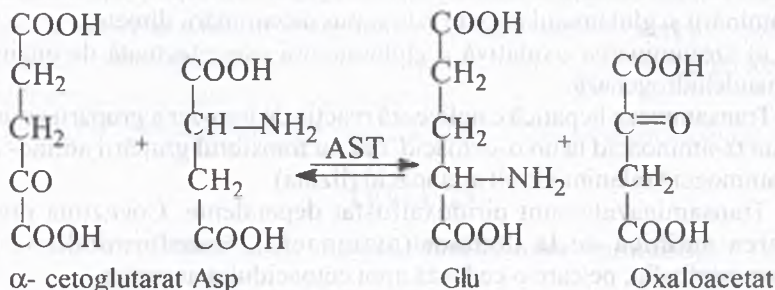
d)


COOH
CH2
CH2
CH—NH2
COOH
+ CO2
Vit.K
COOH
CH—COOH
CH2
CH—NH2
COOH
Glu
γ- Carboxiglutamat

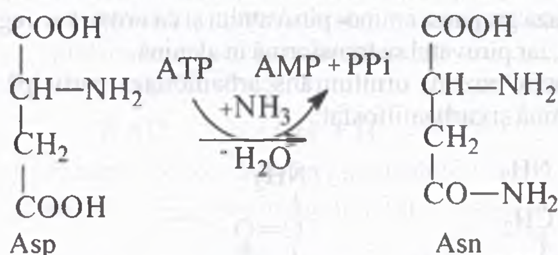
e)



8. a)

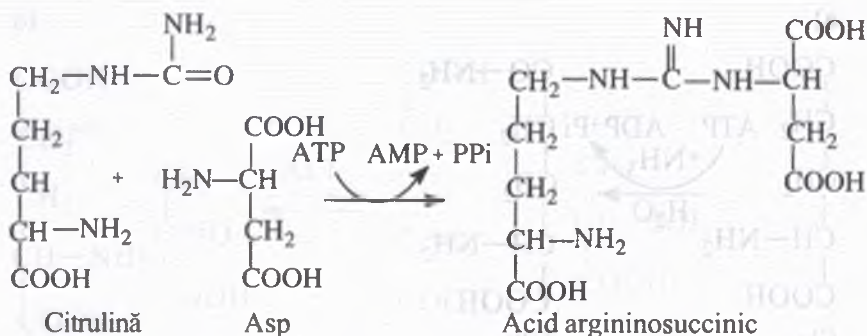


b)



c) Aspartatul participă atît la sinteza nucleotidelor purinice, cît şi la sinteza de novo a nucleotidelor pirimidinice. N-1 din nucleul purinic provine din aspartat, aspartatul este sursa N-1 şi a atomilor de carbon (C_4, C_5, C_6) din nucleul pirimidinic.

Aspartatul este implicat în sinteza ureei şi anume în reacţia de transformare a citrulinei în acidul argininosuccinic.



e) Aspartatul nu se supune dezaminării oxidative directe, dar dezaminării indirecte sau procesului de transdezaminare, deci la început Asp se supune transaminării şi glutamatul obţinut este supus dezaminării directe.

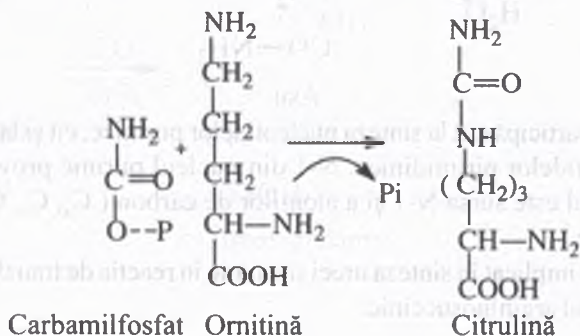
9. a) Dezaminarea oxidativă a glutamatului este efectuată de enzima glutamatdehidrogenaza.

b) Transaminaza hepatică catalizează reacţia de transfer a grupării amino de la un α-aminoacid la un α-cetoacid, dar nu transferul grupării amino- de la un aminoacid (alanina) la alt aminoacid (lizina).

c) Transaminazele sunt piridoxalfosfat dependente. Coenzima preia gruparea aminică de la donator (aminoacid), transformîndu-se în piridoxaminfosfat, pe care o cedează apoi cetoacidului acceptor.

d) şi e) Piridoxalfosfatul intră în reacţie cu glutamatul şi ca urmare glutamatul se transformă în α-cetoglutarat, iar piridoxalfosfatul în piridoxaminfosfat. Apoi piridoxaminfosfatul cedează gruparea amino- piruvatului şi ca urmare se regenerează piridoxalfosfatul, iar piruvatul se transformă în alanină.

10. În ciclul ureogenetic enzima ornitintranscarbamoilaza participă la sinteza citrulinei din ornitină şi carbamilfosfat:



11. Creşterea activităţii transaminazelor din serul sanguin se observă în infarctul miocardic, hepatite şi traume vaste ale muşchilor.

12. a) Aminele biogene se formează în urma decarboxilării aminoacizilor sub influenţa decarboxilazelor aminoacizilor care utilizează drept coenzimă piridoxalfosfatul.

b) Aminele biogene sunt substanţe farmacologic active care exercită influenţă variată asupra funcţiilor fiziologice ale organismului.

c) Histamina - produsul decarboxilării histidinei - posedă diverse acţiuni biologice (acţiune vasodilatatoare, creşte influxul de leucocite în focarul inflamator, participă la secreţia conţinutului de HCl în stomac, joacă rol important în fenomenele de sensibilizare şi desensibilizare ale organismului).

d) Serotonina - produsul decarboxilării 5-hidroxitriptofanului - în afară de acţiune vasoconstrictoare este implicat în dezvoltarea alergiei, toxicozei gravidelor, sindromului carcinoid, diatezelor hemoragice. Serotonina este un mediator al proceselor nervoase din SNC.

e) Acidul gama-aminobutiric posedă acţiune inhibitorie asupra activităţii SNC.

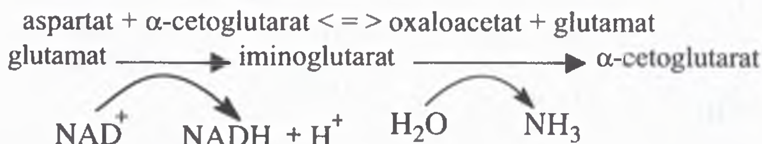
TEMA 23

Particularităţile metabolismului unor aminoacizi

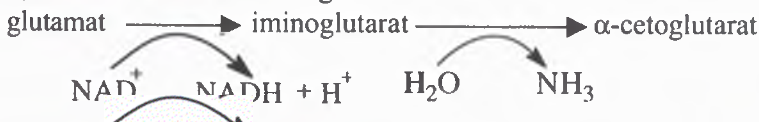
1. Amoniacul se formează la:

a) dezaminarea indirectă a aminoacizilor:

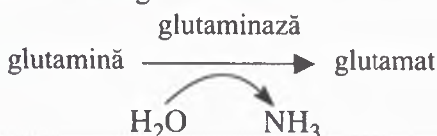
aspartat + α-cetoglutarat < = > oxaloacetat + glutamat



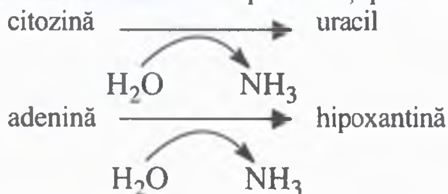
b) dezaminarea oxidativă a glutamatului:



c) dezaminarea glutaminei:

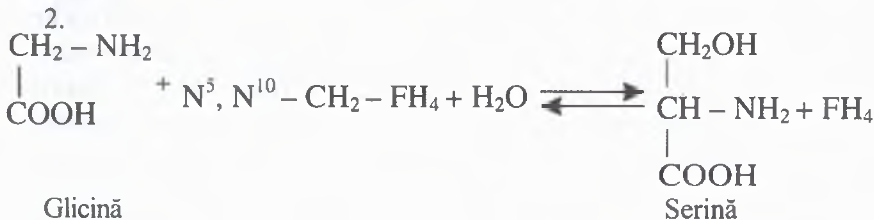


d) dezaminarea bazelor purinice și pirimidinice:

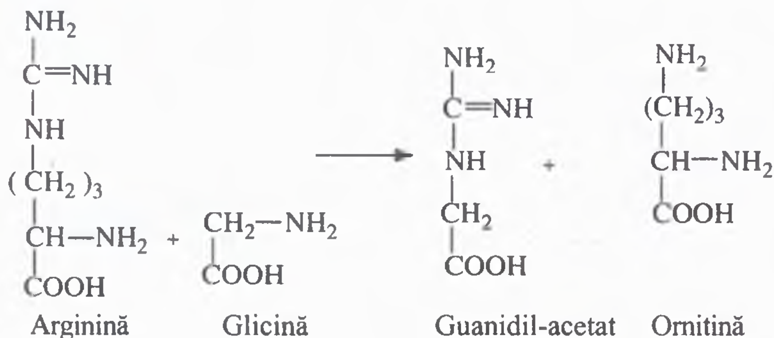


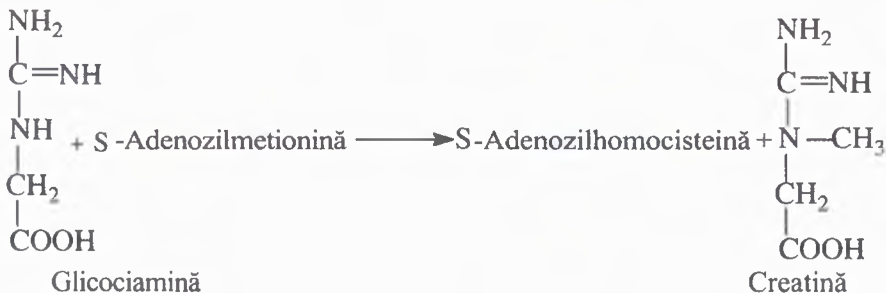
e) Noradrenalina → Normetanefrina $\xrightarrow{NH_3}$ Acidul 3-metoxi-4-hidroxi-mandelic.

2.



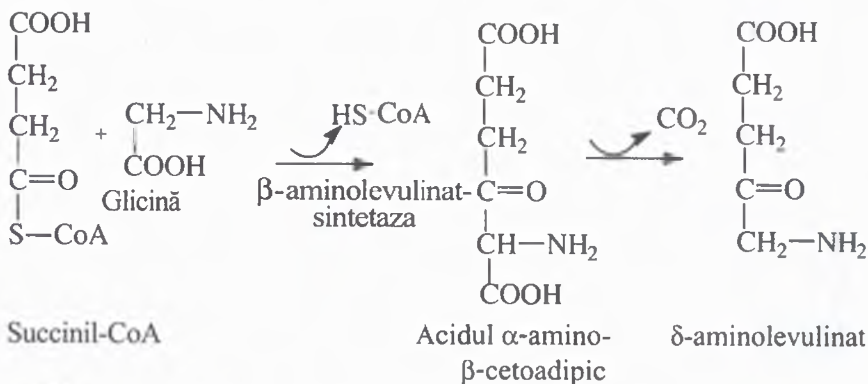
b)



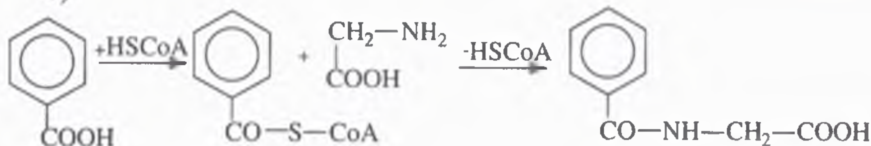


c) Glicina este sursa atomilor N_7, C_4 şi C_5 ale inelului purinic.

d)

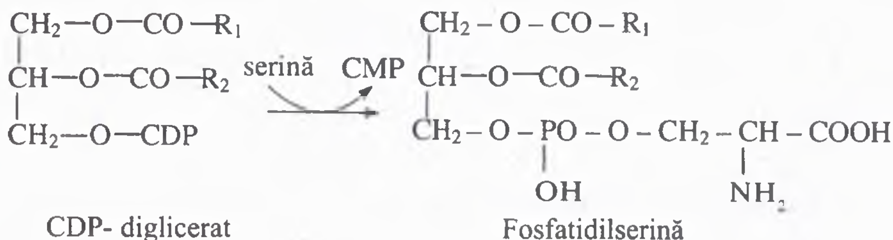


e)



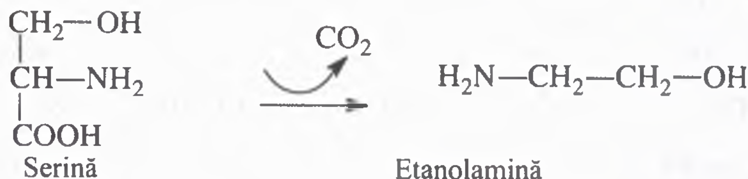
Acidul benzoic Benzoil-CoA + Glicina Acidul hipuric

3. a)



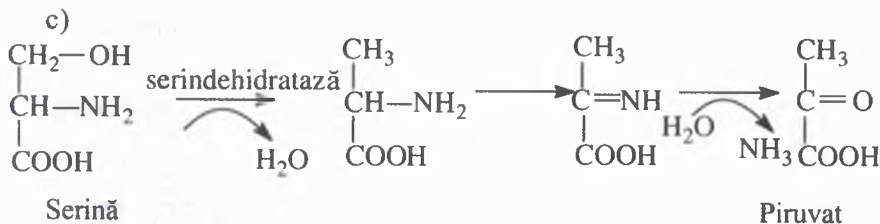
CDP- diglicerat Fosfatidilserină

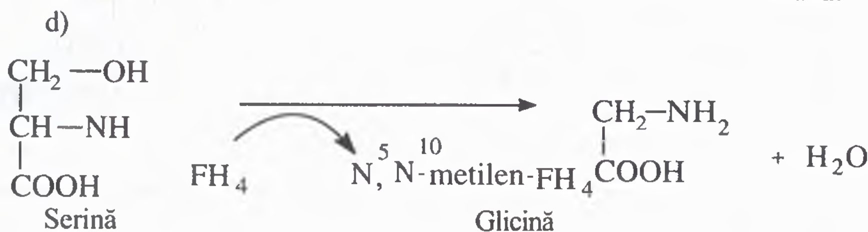
b)

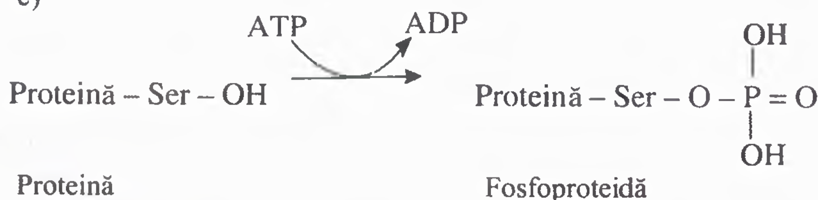


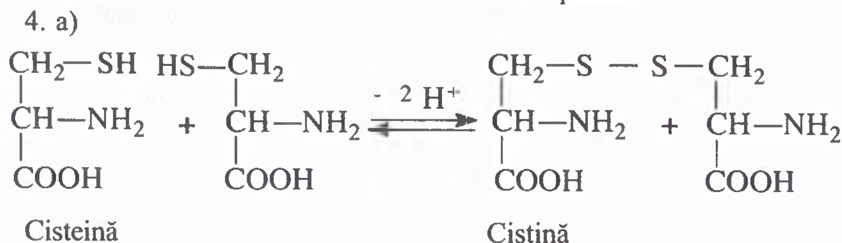
Serină Etanolamină

(sau fosfatidilserină) → (sau fosfatidiletanolamină)

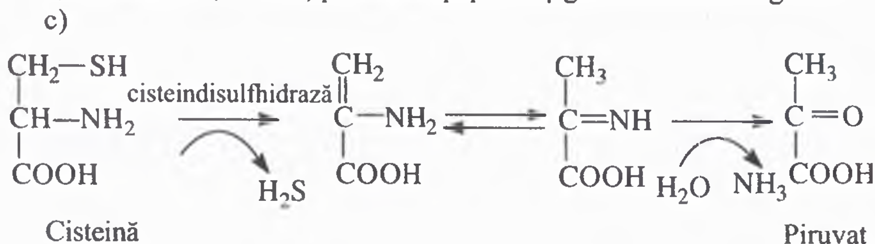




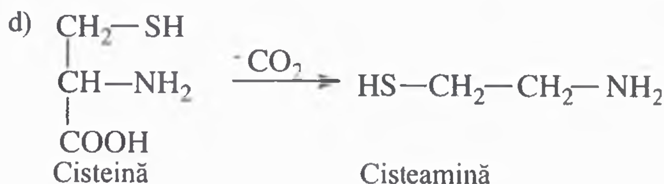




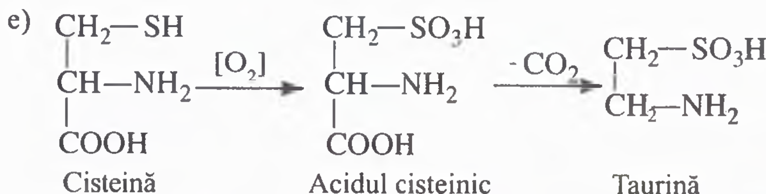
b) Glutationul (G - SH) prezintă tripeptidul γ-glutamil-cisteinil-glicină.



d)

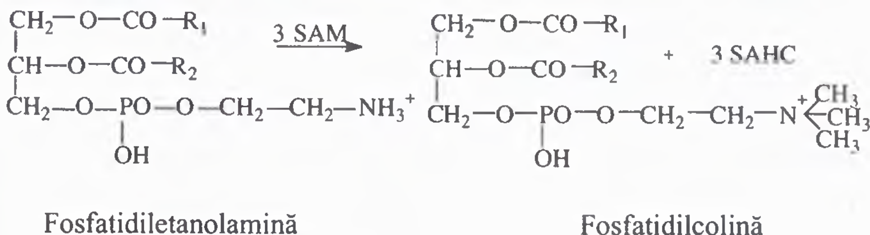


e)



5. S-Adenozilmetionina (SAM) este forma activă a metioninei şi se obţine din metionină şi ATP; participă la diverse reacţii de metilare.

a) Transformarea fosfatidiletanolaminelor în fosfatidilcoline (lecitine):



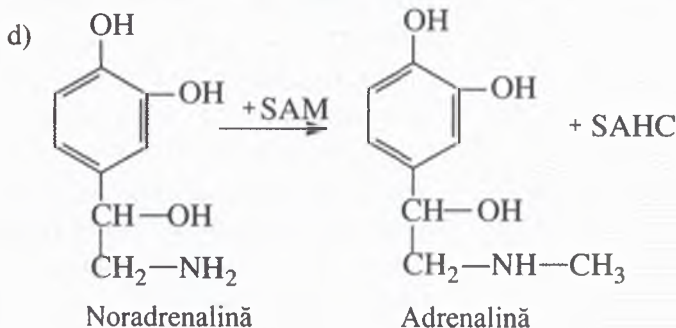
Fosfatidiletanolamină Fosfatidilcolină

b) guanidilacetat + s-adenozilmetionină → creatină + s-adenozilhomocisteină (SANC).

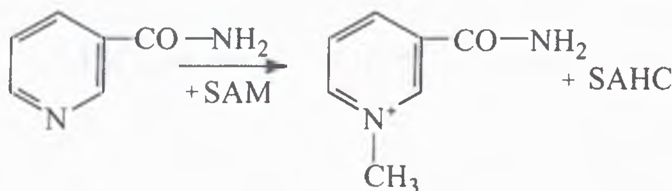
c) La sinteza timinei (mai exact a dTMP) participă N^5,N^{10}-CH_2-FH_4.

dUMP + N^5,N^{10}- metilentetrahidrofolat → dTMP + dihidrofolat

d)



e)



Nicotinamidă N-metilnicotinamidă

6. Glutamină transformîndu-se în acid glutaminic, cedează prin dezaminare gruparea - NH_2, utilizată la sinteza nucleotidelor purinice şi pirimidinice, la sinteza carbamoilfosfatului, la sinteza NAD-ului şi aminozaharidelor.

7. Tirozina serveşte ca precursor în sinteza hormonilor tiroidieni (tiroxinei şi triiodtironinei), catecolaminelor (noradrenalina şi adrenalina) şi pigmentului melanină. Serotonina este produsul decarboxilării 5-hidroxitriptofanului, fenilalanina este un aminoacid esenţial din care se formează la hidroxilare tirozina.

8. Defecte în metabolismul unor aminoacizi şi consecinţele acestora:

Denumirea afecţiunii	***Cauze şi forma de manifestare***
Fenilcetonuria	Absenţa fenilalaninhidroxilazei. Fenilalanina →Fenilpiruvat şi Fenillactat, produşi toxici pentru creier. Întîtzierea dezvoltării mintale.
Alcaptonuria	Absenţa homogentizatoxidazei. Homogentizatul se elimină prin urină şi în contact cu aerul formează un pigment negru
Albinismul	Lipsa tirozinazei - enzimă ce iniţiază oxidarea tirozinei pentru formarea melaninei. Părul şi pielea nu sunt colorate.
Boala urinei cu miros de arţar	Absenţa α-cetoaciddehidrogenazei, leucina, izoleucina şi valina se elimină prin urină alături de cetoacizii corespunzători (care dau mirosul caracteristic).

Boala Hartnup	Absorbţie defectuoasă a triptofanului. Cantităţi mari de triptofan sunt expuse acţiunei florei microbiene ceea ce duce la formarea şi excreţia de compuşi indolici (indolilacetat, indican).


9. 2Aspartat + 2 α-cetoglutarat + 2 GTP+2ATP + $4H_2O$+2NADH + $2H^+$ →

Glucoză + 2glutamat + $2CO_2$ + 2ADP + 2GDP + $2NAD^+$ + $4H_3PO_4$


10. Aspartat + CO_2 + NH_4^+ + 3ATP + $3H_2O$ → Oxaloacetat + uree + +2ADP + 1AMP + $4H_3PO_4$ + NADH + H^+


11. Glucoză + 2glutamat + 2ADP + AMP + $4H_3PO_4$ + NAD^+ → →2Alanină + 2 α-cetoglutarat + 2ATP + 2NADH + $2H^+$ + $2H_2O$.

12. Nivelul constant de ATP este menţinut datorită reformării ATP-ului prin reacţia catalizată de CPK:

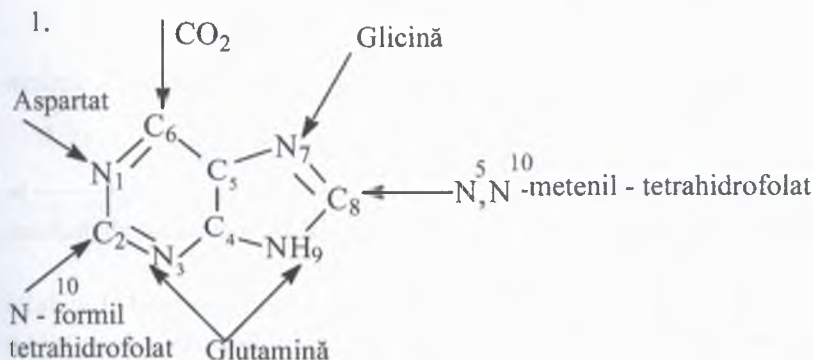

ADP + creatin-fosfat → ATP + creatină.

Creatininfosfokinază

TEMA 24

Metabolismul nucleotidelor. Chimia şi metabolismul cromoproteidelor

1.

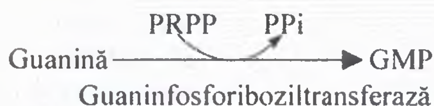


2.

a) condensarea bazei purinice cu PRPP;

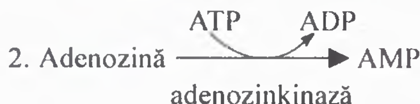


Adeninfosforiboziltransferază



b) Încorporarea purinei în nucleotid în două etape:

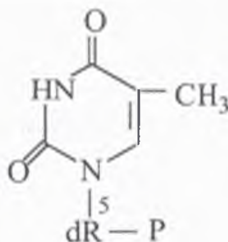
1. Riboză 1-P + adenină → adenozină + P;

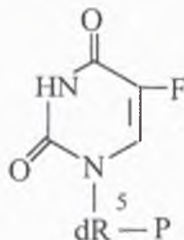


3.

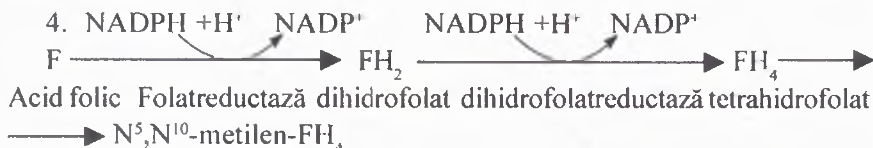


N^5,N^{10}-metilen-FH_4→ H_2-folat-5-fluordezoxiuridilatul este analogul structural al acidului timidilic.



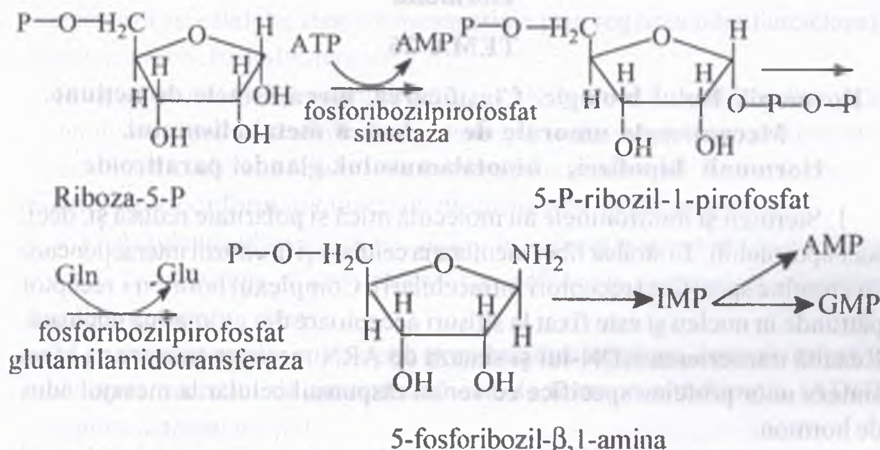


5-Fluor-dUMP inhibă timidilatsintetaza şi astfel blochează sinteza ADN-ului.



Metotrexatul (10-metilaminopterina) este analogul structural al acidului folic şi inhibă dihidrofolatreductaza. Inhibiţia dihidrofolatreductazei nu permite formarea tetrahidrofolatului şi, deci, şi a N^5,N^{10}- metilen-FH_4 necesar în sinteza dTMP. Întrucît sinteza ADN-ului este limitată de deficitul de dTMP scade sinteza de ADN, diviziunea celulară şi creşterea ţesuturilor.

5. Azaserina este un inhibitor al enzimelor care participă la transferul grupării amido- de la glutamină la un oarecare acceptor.



Deoarece azaserina inhibă fosforibozilpirofosfatglutamilamidotransferaza, în celule se acumulează 5-fosforibozil-1-pirofosfatul.

6. dUMP + serina + NADPH + H^+ → dTMP + glicina + $NADP^+$ + H_2O

7. N_2 → NH_4^+ → Glutamat → Serina → Glicina → b-Aminolevulinat → → Porfobilinogen → Hem.

8. a) 16400 g/mol;

a) în molecula de hemoglobină se conţin 4 atomi de fier.

9. La bolnav se poate presupune icterul hemolitic în baza nivelului înalt de bilirubină indirectă în sînge şi creşterii conţinutului de pigmenţi biliari în fecale şi urină.

CAPITOLUL VII

Hormonii

TEMA 26

Hormonii. Rolul biologic. Clasificarea, mecanismele de acţiune. Mecanismele umorale de reglare a metabolismului. Hormonii hipofizei, hipotalamusului, glandei paratiroide

1. Steroizii şi iodtironinele au moleculă mică şi polaritate redusă şi, deci, sunt liposolubili. Ei străbat liber membrana celulară şi în citozol interacţionează cu proteine specifice (receptori intracelulari). Complexul hormon - receptor pătrunde în nucleu şi este fixat la sitisuri acceptoare din cromatina nucleară. Rezultă transcrierea ADN-lui şi sinteza de ARN mesager care are ca efect sinteza unor proteine specifice ce vor da răspunsul celular la mesajul adus de hormon.

Hormonii hidrosolubili (peptidici, catecolaminele) nu pătrund în celule, ei interacţionînd cu receptorii membranari. Complexul hormon- receptor prin intermediul proteinelor G modifică activitatea enzimelor membranare - adenilatciclazei, fosfolipazei C - şi concentraţia ionilor de Ca^{2+} în citozol ceea ce duce la formarea mesagerilor secunzi - AMP - ciclic, Ca^{2+}, diacilglicerol, inozitolfosfaţi etc. Mesagerul hormonal secund transformă semnalul primar extracelular într-un răspuns intracelular.

2. Fosfodiesteraza descompune AMP ciclic: AMPc + H_2O -----→ AMP

Activitatea ei este stimulată de diverşi factori: de ionii de calciu, prostaglandine, insulină. Din contra, steroizii, hormonii tiroidieni şi metilxantinele (cofeina, teofilina) scad activitatea enzimei, prelungind durata de acţiune a AMP - ciclic.

3. Reacţia adenilatciclazei determină o acumulare de PPi şi datorită afinităţii sale pentru Ca^{2+} are loc un influx de Ca^{2+} din spaţiul extracelular. Creşterea concentraţiei de Ca^{2+} citozolic inhibă adenilatciclaza şi activează fosfodiesteraza. Prin reducerea activităţii adenilatciclazei scade concentraţia PP_i şi influxul de ioni Ca^{2+} se opreşte.

Rolul reglator al calciului este mediat de o proteină, numită calmodulina, care leagă ionii de calciu, formînd complexul activ Ca^{2+} - calmodulina. Acesta

reglează activitatea unor proteinkinaze, activează pompa de calciu, reglează contracţia muşchilor netezi şi a microfilamentelor din celule nemusculare, interferează cu celelalte sisteme mesageriale prin reglarea adenilatciclazei, guanilatciclazei, fosfodiesterazei.

Interacţiunile dintre calmodulină şi calciu, şi Ca^{2+} - calmodulină şi proteină sunt uşor reversibile. La încetarea stimulării celulare, concentraţia intracelulară a calciului scade, calmodulina eliberează ionii de Ca^{2+} şi suferă tranziţia spre conformaţia inactivă, desprinzîndu-se de pe proteină.

4. Diabetul insipid se manifestă clinic prin poliurie hipoosmolară (densitate < 1005, osmolaritate < 280 mOsm/l) şi polidipsie compensatoare (prin stimularea centrului setei).

Lezarea sistemului supraoptic (traumatisme craniene, tumori, infecţii) şi scăderea secreţiei de vasopresină sau de hormon antidiuretic (ADH) determină diabetul insipid.

Ţesuturile ţintă ale vasopresinei sunt tubii renali la nivelul cărora creşte permeabilitatea pentru apă, determinînd conservarea apei şi eliminarea unei urine hiperosmotice.

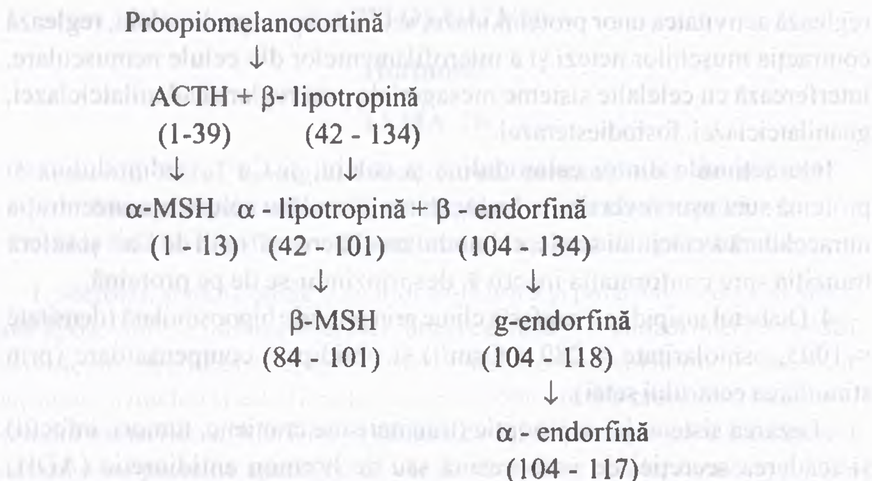
În diabetul zaharat cauzat de factori fiziopatologici ce determină hipofuncţia insulinică, scade utilizarea glucozei şi creşte gluconeogeneza hepatică. Aceasta duce la hiperglicemie şi la glucozurie care şi determină o diureză osmotică, deci poliuria.

Diabet zaharat de tip I : Tratament - insulină + dietă

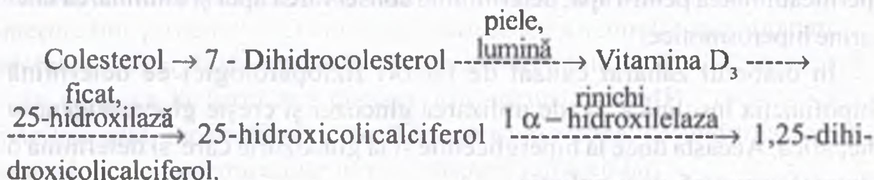
Diabet zaharat de tip II: Tratament - regim alimentar + antidiabetice orale.

5. Două proprietăţi caracterizează endorfinele sau peptidele opioide endogene: capacitatea de a se lega de receptorii pentru morfină din membranele celulare din ţesutul cerebral şi capacitatea de a produce efecte biologice asemănătoare acţiunilor farmacologice ale morfinei, îndeosebi efectul analgezic.

Endorfinele sunt de natură peptidică şi se formează din β- lipotropină, care are o origine comună cu ACTH-ul într-un precursor prezent în lobul anterior al hipofizei, denumit propiomelanocortină.



6. Homeostazia Ca extracelular este asigurată de hormonii paratiroidian, calcitonină şi 1,25 - dihidroxicolicalciferol (1,25 $(OH)_2$ - D_3).



Calcitriolul posedă ca şi PTH efect hipercalcemiant prin inducerea sintezei unei proteine de legare a calciului din intestin, unde facilitează absorbţia calciului şi a fosfatului.

7. Calcitonina are acţiune hipocalcemiantă. La nivelul osului intervine prin blocarea resorbţiei osoase, prin inhibiţia sintezei de 1,25 - dihidroxicolicalciferol, diminuează absorbţia intestinală de calciu. La concentraţii mai mari creşte eliminarea renală de Ca^{2+} şi Mg^{2+}. Calcitonina favorizează translocarea fosfatului din lichidul extracelular în fluidul periostal şi în celulele osoase.

8. 3′,5′-AMPc este mediatorul următorilor hormoni: corticotropinei, adrenalinei, insulinei şi vasopresinei.

TEMA 27

Hormonii pancreasului şi glandei tiroide. Structura, biosinteza, rolul metabolic şi reglarea secreţiei lor

1. Preproinsulina
↳ polipeptidă (23AA)
Proinsulina
↳ peptida C
Insulina

Datorită succesiunii de semnalizare, proiunsulina sintetizată din preproinsulină ajunge la locul de destinaţie în celulă şi, anume, în granulele secretoare. Proinsulina se acumulează în granule pînă cînd celula primeşte semnal despre necesitatea secreţiei de insulină. În acest moment proinsulina se transformă în insulină activă sub acţiunea peptidazelor specifice care înlătură peptidul C.

2. În doze mari, farmacologice, hormonii tiroidieni accelerează arderile tisulare, creşte consumul de oxigen, viteza metrabolismului bazal, diminuează depozitele de rezerve energetice glucidice şi lipidice; catabolismul proteic se intensifică (bilanţ azotat negativ).

Acţiunea catabolică, calorigenă reflectă rolul reglator al hormonilor tiroidieni asupra proceselor mobilizatoare de energie din organism. Accelerarea oxidărilor celulare poate să rezulte prin:

creşterea sintezei de Na^+/K^+-ATP-ază (pompa de sodiu este consumatorul principal de ATP),

creşterea raportului ADP/ATP mitocondrial (ADP stimulează fosforilarea oxidativă şi creşterea consumului de oxigen),

diminuarea gradului de cuplare a fosforilării oxidative,

creşterea numărului de mitocondrii şi a dimensiunilor membranelor mitocondriale interne.

3. Somatostatina, sau factorul inhibitor al eliberării hormonului de creştere, este un oligopeptid ce cuprinde 14 resturi aminoacidice. Se sintetizează în hipotalamus şi este denumită astfel datorită capacităţii sale de a inhiba eliberarea hormonului somatotrop din hipofiza anterioară; ea inhibă de asemenea şi eliberarea de tireotropină de către TRH.

Somatostatina se sintetizează şi în celulele D ale ţesutului insular din

pancreas precum şi în celulele D ale tractului digestiv. Ea exercită efecte inhibitoare marcate asupra secreţiei de insulină, glucagon, gastrină, secretină, colecistokinază.

Somatostatina este utilizată în tratamentul unor forme de diabet zaharat.

4. Creierul şi sistemul nervos periferic utilizează ca substrat energetic aproape în exclusivitate glucoza. Manifestările clinice ale hiperinsulinismului sunt atribuite hipoglicemiei (< 50 mg/dl dozare plasmatică). Simptomatologia caracteristică hipoglicemiei apare în condiţiile unei scăderi bruşte a glucozei din sînge şi include următoarele tulburări nervoase: astenie, depresii, convulsii, parestezii, tulburări de echilibru, tulburări psihotice, comă.

5. Diabetul zaharat este rezultatul hipofuncţiei pancreatice (deficit de insulină) sau diminuării răspunsului la insulină al celulelor ţintă (lipsa receptorilor insulinici).

Utilizarea defectuoasă a glucozei de către ţesuturile periferice (muşchi şi ţesut adipos) determină apariţia în diabetul zaharat a hiperglicemiei şi glucozuriei. Hiperglicemia primară, prin scăderea transportului transmembranar de glucoză în ţesuturile insulino-sensibile, este amplificată ulterior prin gluconeogeneză hepatică din aminoacizi şi glicerol.

Hipoinsulinismul perturbă într-o măsură considerabilă metabolismul lipidic. Este intensificată lipoliza în ţesutul adipos cu creşterea consecutivă a concentraţiei plasmatice a acizilor graşi liberi şi a glicerolului. Glicerolul este utilizat în ficat ca substrat gluconeogenetic (hiperglicemie). Acizii graşi la nivelul ficatului sunt parţial reîncorporaţi în trigliceride exportate spre ţesuturile periferice ca lipoproteide cu densitate foarte mică (hiperlipemie cu hiperlipoproteinemie), altă fracţiune din acizii graşi suferă β- oxidare cu producţie de acetil - CoA. Excesul de acetil-CoA este dirijat spre cetogeneză (hipercetonemie, cetonurie) şi spre sinteză de colesterol (hipercolesterolemie).

6. Insuficienţa hipofizară în copilărie, cu afectarea preponderentă a celulelor ce secretă somatotropină, determină încetinirea creşterii - nanism hipofizar. Pentru nanismul hipofizar este caracteristică dezvoltarea proporţională a corpului, activitatea psihică fiind normală. Hipofuncţia tiroidiană severă instalată în perioada prenatală sau imediat după naştere determină tulburări de creştere şi dezvoltare neproporţională a corpului (nanism hipotiroidian), diminuarea funcţiilor neuropsihice (cretinism).

TEMA 28

Hormonii suprarenalei. Structura, rolul metabolic, biosinteza şi reglarea secreţiei lor. Hormonii sexuali. Hormonoizii

1. Glucozo-6-fosfatul suferă transformări diferite în ficat şi în muşchi. În ficat glucozo-6-fosfatul poate urma două căi principale:

a) este hidrolizat până la glucoză şi acid fosforic sub acţiunea glucozo-6 -fosfatazei hepatice, ficatul este organul principal care trimite glucoză în sînge;

b) este degradat prin secvenţa glicolitică şi ciclul acizilor tricarboxilici în vederea mobilizării de energie. Întrucît ficatul dispune şi de alte substrate energetice, glucozo-6-fosfatul este utilizat într-o proporţie redusă pentru a furniza energie, cea mai mare cantitate servind la homeostazia glicemică.

Ţesutul muscular nu este echipat cu glucozo-6-fosfataza şi nu poate forma glucoză liberă. În muşchi unica modalitate de utilizare a glucozo-6-fosfatului este degradarea sa pînă la acid piruvic sau acid lactic, care în continuare se oxidează pînă la CO_2 şi apă.

2. Hipercorticismul, după natura defectului metabolic sau a zonei corticale afectate, se manifestă print-o secreţie crescută de glucocorticoizi, de mineralocorticoizi sau de androgeni.

Hipercorticolemia se datorează fie unei tumori (adenom, calcinom) suprarenale, fie unei suprasolicitări adrenocorticotrope a corticalei (sindrom sau boala Cushing). Boala se caracterizează prin catabolism proteic excesiv, lipoliză cu depuneri patologice, hiperglicemie (diabet zaharat steroid). Asocierea hipercorticolemiei cu hipersecreţie de aldosteronă completează tabloul clinic cu retenţie de sare, de apă, hipertensiune arterială.

Glucocorticoizii stimulează gluconeogeneza hepatică din aminoacizii glucoformatori (produc hiperglicemie), măresc depozitarea glicogenului în ficat, stimulează degradarea proteinelor şi facilitează pătrunderea aminoacizilor în hepatocit, mobilizează lipidele şi favorizează depunerile patologice de grăsimi (ceafă, faţă, abdomen).

3. Mecanismul de acţiune al toxinei holerice constă în faptul că ea activează pompa de sodiu din celulele mucoasei intestinale ceea ce determină pierderi masive de ioni de Na şi de apă. Toxina holerică

inactivează GTP-aza intrinsecă a subunității as, proteina G, rămînînd în stare activă (as - GTP), activează adenilatciclaza. Producția de AMPciclic este continuă. AMPciclic activează pompa de Na care elimină ionii de Na și apă.

4. Hiperpigmentația progresivă a tegumentelor și mucoaselor în boala Adison se explică prin deficitul cortizolic, ce are ca urmare hipersecreția continuă de ACTH, din care se sintetizează hormonul α melanocitostimulator (α MSH).

5. În practica oncologică, ca tratament suplimentar, se recomandă prescrierea hormonilor, deoarece hormonii sexuali inhibă secreția hormonilor de sex opus.

CAPITOLUL VIII

Biochimia sîngelui

TEMA 29

Biochimia sîngelui.
Metabolismul elementelor figurate ale sîngelui

1. În eritrocite, nivelul ridicat al ATP-ului este menţinut prin 2 mecanisme:

a) fosforilarea la nivel substrat glicolitică;

b) prin reacţie adenilatkinazică reversibilă.

Refacerea rezervei de ATP este însoţită de formarea stoichiometrică de AMP, care declanşează dezaminarea nucleozidelor la hipoxantină. După prima săptămînă de păstrare a sîngelui conservat are loc echilibrarea celor două sisteme, din acest motiv nivelul ATP-ului descreşte.

2. NADP-ul din ciclul pentozofosfaţilor condiţionează nivelul optim al glutationului redus şi în parte reducerea methemoglobinei.

3. Trăsăturile principale ale bactericidiei sunt:

a) creşterea consumului de oxigen;

b) stimularea şuntului pentozofosfaţilor;

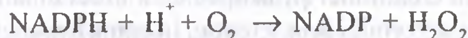
c) producerea de apă oxigenată, de anioni superoxid şi în mai mică măsură $^1O_2$ (singlet).

Consumul de oxigen crescut şi producerea de H_2O_2 ar proveni din oxidarea NADH, generat în glicoliza anaerobă şi al NADPH format în şuntul pentozofosfat:



a) $NADH + H^+ + O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O_2$

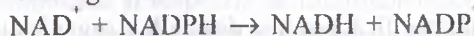
NADH-oxidaza



$NADPH + H^+ + O_2 \rightarrow NADP + H_2O_2$

NADPH-oxidaza

b) Legătura dintre aceste două sisteme se stabileşte prin activarea transhidrogenazei:



$NAD^+ + NADPH \rightarrow NADH + NADP^+$

transhidrogenază

c) Corelarea cu activitatea enzimelor implicate în sistemul glutation oxidat-glutation redus:



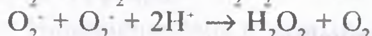
$2H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + G\text{-}S\text{-}S\text{-}G$

glutationperoxidază

d) Producerea de H_2O:



$O_2^- + 2H_2O \rightarrow 2H_2O_2$ sau



$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

4. În biologia trombocitului există un singur moment în care el este angajat într-o mare cheltuială de energie: metamorfoza vîscoasă şi retracţia cheagului.

TEMA 30

Biochimia sîngelui. Componenţa chimică a plasmei sanguine. Ionograma. Echilibrul acido-bazic

1. Albuminile constituie 55-60% (35-45 g/l) din totalitatea proteinelor plasmatice. Ele se sintetizează în ficat. Una din funcţiile principale ale albuminelor este menţinerea presiunii coloidosmotice a plasmei. Micşorarea concentraţiei proteinelor plasmatice (sub 30 g/l) contribuie la modificarea presiunii oncotice şi la deplasarea apei din compartimentul intra- în cel extravascular şi respectiv, la apariţia edemelor. Scăderea marcată a albuminelor plasmatice în patologiile menţionate este cauzată de:

a) insuficienţa funcţională a ficatului în cazul cirozelor hepatice;

b) insuficienţa alimentară în inaniţie;

c) din cauza pierderii albuminelor cu urina în glomerulonefrită.

2. Azotul neproteic din sînge reprezintă azotul din compuşii: uree, acid uric, creatinină, creatină, aminoacizi, purine, nucleotide, amoniac, bilirubină, glutation, indican etc. Valorile normale ale azotului neproteic sunt 14,28-28,56 mM/l. În glomerulonefrită, din cauza diminuării funcţiei excretoare a rinichilor, va creşte concentraţia creatininei şi, în special, a ureei în sînge. Aceste modificări duc la apariţia azotemiei prin retenţie. În coma hepatică şi în stările terminale ale cirozelor hepatice apare hiperamoniemia ca urmare a insuficienţei hepatice, şi dezvoltării unei circulaţii colaterale prin care sîngele portal ocoleşte ficatul.

3. Interferonul este o proteină specifică, produsă de celulele organismului infectat de un virus. Interferonul acţionează asupra ADN-polimerazei virale sau induce sinteza unei proteine antivirale, care devine agentul inhibitor al înmulţirii diferitor feluri de virusuri. Prin urmare, interferonul previne înmulţirea virusurilor, dar nu distruge virusurile deja prezente în organism.

4. Bicarbonații plasmei sangvine poartă denumirea de rezervă alcalină. La pH-ul sangvin egal cu 7,4 raportul HCO_3^-/H_2CO_3 constituie 20:1. Acest raport este menținut prin mecanismele fizico-chimice (celelalte sisteme tampon) și fiziologice (în special de pulmoni și rinichi).

În acidozele respiratorii (care apar din cauza unor tulburări ale ventilației pulmonare) crește concentrația sangvină de acid carbonic (hipercapnie) și evident se va produce și o creștere a rezervei alcaline pentru menținerea constantă a raportului HCO_3^-/H_2CO_3 și a pH-ului sangvin.

În acidozele metabolice (produse de acumularea în sînge a acizilor nevolatili – lactat, piruvat, acetoacetat etc.) oricare ar fi acidul, el descompune bicarbonații și rezerva alcalină scade.

Alcalozele respiratorii sunt caracterizate prin scăderea primară a H_2CO_3 din cauza eliminării excesive de CO_2. Prin urmare, rezerva alcalină se micșorează.

Alcalozele metabolice se caracterizează prin exces de alcali și rezultă fie prin raport exagerat de substanțe alcaline, fie consecutiv, prin pierderi urinare a unor electroliți. Deci, în alcalozele metabolice rezerva alcalină crește.

5. Conform clasificației funcționale a enzimelor plasmatice, fosfataza alcalină, leucinaminopeptidaza și γ-glutamiltransferaza fac parte din enzimele excretorii. Investigațiile biochimice indică afectarea sistemului hepatobiliar.

6. Principalele investigații enzimatice cu valoare diagnostică pentru mușchiul scheletic sunt:

1) fructozo-1,6-difosfataldolaza – din clasa liazelor;

2) izoenzimele lactatdehidrogenazei – din clasa oxidoreductazelor;

3) izoenzimele creatinfosfokinazei – din clasa transferazelor.

În afectarea mușchiului scheletic crește activitatea fructozo-1,6-difosfataldolazei, LDH_5 (în special) și creatinfosfokinazei MM.

7. În ficat se sintetizează toate albuminele, α-globulinele 75-80%, β-globulinele – 50%. În cazul cirozelor, capacitatea funcțională a ficatului diminuează și respectiv se modifică spectrul fracțiilor proteice sangvine. Fracțiile albuminelor, α_1-globulinelor se micșorează, γ-globulinelor - cresc și contopesc cu fracția β-globulinelor.

În sindromul nefrotic creșterea permeabilității membranei glomerulare duce la trecerea în urină a unei cantități importante de proteine. Organismul pierde peste 6 g de proteine în 24 ore. Din aceste considerente se modifică

fracţiile proteice în sînge: albuminele α_1- şi γ-globulinele se micşorează, α_2-globulunele cresc, β- globulinele – în limitele normei.

8. Procesul inflamator include:

a) reacţia locală a ţesutului care este determinată de eliberarea mediatorilor inflamaţiei (histaminei, serotoninei, chininelor), enzimelor lizosomale şi prostaglandinelor;

b) reacţia întregului organism care se exprimă nu numai prin dureri, febră, leucocitoză, ci şi prin creşterea considerabilă a glicoproteidelor în plasma sanguină.

Aceste glicoproteide poartă denumirea de "proteinele fazei acute". Unele din ele se găsesc în plasmă în cantităţi infime, iar altele absentează în condiţii fiziologice, dar se sintetizează şi apar în plasmă în caz de inflamaţie.

Din proteinele fazei acute fac parte: proteina C reactivă, haptoglobina, β_1-transferina, α_1-antitripsina, ceruloplasmina, componentele C_3 şi C_4 ale complementului.

Spectrul fracţiilor proteice din sînge în fază acută a procesului inflamator indică: α_1- şi α_2-globulinele.

TEMA 31

Mecanismele biochimice ale transportului şi schimbului de gaze în sînge. Hemostaza. Reglarea stării fluide a sîngelui

1. b)

2. d)

3. a), c), d).

4. Vitamina K este sintetizată în organismul uman de către bacteriile intestinale. Ea este implicată în biositeza protrombinei (factorul II) şi a altor factori de coagulare (7, 9, 10). Toţi aceşti factori ai coagulării sunt sintetizaţi în ficat. Vitamina K îndeplineşte rolul de cofactor al γ-glutamilcarboxilazei care catalizează reacţia de γ-carboxilare a resurselor de acid glutamic din moleculele factorilor de coagulare sus-numiţi. La tratarea îndelungată a bolii infecţioase cu antibiotice, flora microbiană intestinală este suprimată, şi deci, se va dezvolta o deficienţă de vitamina K în organism, ceea ce poate duce la hemoragie.

5. Deficitul de vitamină K produce hipoprotrombinemie, ceea ce conduce la prelungirea timpului de coagulare şi apariţia hemoragilor.

În afecţiunile severe ale parenchimului hepatic (icter parenchimatos, ciroze etc.) este alterată sinteza factorilor complexului protrombinic şi de asemenea apar hemoragiile.

Vitamina K din alimentele ingerate este absorbită la nivelul jejunului şi acest proces depinde de absorbţia normală a grăsimilor care, la rîndul ei, este asociată cu disfuncţia pancreatică, obstrucţii biliare, atrofierea mucoasei intestinale sau altor diverse cauze de steatoree.

6. Transfuzia de sînge sau plasmă nativă este efectuată în scop hemostatic întrucît sîngele sau plasma nativă conţin toţi factorii plasmatici de coagulare sangvină. Sîngele integru mai conţine şi factorii trombocitari, care declanşează hemostaza graţie căreia se opresc hemoragiile determinate de lezarea vaselor mijlocii şi mici.

7.

Nr. d/o	Indicii	Valorile normale	Hipocoagularea	Hipercoagularea
1.	Indicele protrombinic (%)	80-100	↓	↑
2.	Timpul de recalcifiere a plasmei (sec)	60-120	↓	↑
3.	Timpul protrombinic (sec)	15-18	↑	↓
4.	Fibrinogenul (g/l)	2-4	↓	↑
5.	Timpul fibrinolitic (min)	183-263	↓	↑

TEMA 33

Biochimia ţesuturilor şi umorilor

1. Integral în ficat se sintetizează albuminele. Diminuarea cantităţii lor duce la micşorarea presiunii oncotice sanguine, extravazarea apei şi apariţia edemelor.

2. Ureogeneza este un proces specific hepatic, deoarece două reacţii ale ciclului sunt catalizate de enzimele hepatospecifice, ornitincarbamil transferaza şi arginaza.

3. Ciclul pentozofosfaţilor furnizează NADPH H^+-ul necesar oxidării microsomiale a substanţelor nocive şi reacţiilor de reducere la biosinteza acizilor graşi şi colesterolului.

TEMA 34

Biochimia ţesutului conjunctiv şi osos

1. Colagen.
2. Hiperparatiroidism.
3. Osteogenezis imperfecta.
4. MPS II, Hunter, enzimă deficitară, induronatsulfataza.
5. MPS IV, Morquio, enzima deficitară, N-acetilgalactozamin-6-sulfataza.

VALORI NORMALE

1. Calciu (Ca) - masa atomică: 40,08

ser	adulţi	total	2,25 – 2,75 mM/l
		ionic	1,07 - 1,58 mM/l
	nou-născuţi	total	1,87 – 3,48 mM/l
	1 - 7 zile	ionic	1,43 – 1,53 mM/l
	sugari	total	2,25 mM/l
	copii mici	total	2,25 mM/l
	copii de şcoală	total	2,25 – 2,75 mM/l
		ionic	1,06 – 1,44 mM/l
urină	adulţi		2,5 – 7,6 mM/d
	sugari		2,75 – 3,4 mM/d

2. Clor (Cl) - masa atomică: 35,453

ser, plasmă	adulţi	95 – 111 mM/l
	nou-născuţi	95 – 100 mM/l
	sugari	54 – 109 mM/l
	copii mici	97 – 109 mM/l
	copii de şcoală	92 – 107 mM/l
elemente figurate	adulţi	48 – 54 mM/l
	copii	50 – 55 mM/l
urină	adulţi	120 – 250 mM/d
	nou-născuţi	0,3 – 1,4 mM/d
	2 - 6 luni	3,0 – 14,0 mM/d
	6 - 12 luni	3,0 – 30,0 mM/d
	1 - 2 ani	14,0 – 40,0 mM/d

Raportul Cl globular/Cl plasmatic = 0,5 - 0,52

3. Cupru (Cu) - masa atomică: 63,546

ser	adulţi	bărbati	11 – 22 µM/l
		femei	13,4 – 24,3 µM/l
		gravide	31,5 µM/l
	copii	nou-născuţi	2,4 – 7,9 µM/l
		0 - 6 luni	pînă la 11,0 µM/l
		6 luni - 5 ani	4,2 – 24,1 µM/l
		5 - 17 ani	pînă la 25,8 µM/l
urină	adulţi		0,27 – 0,79 µM/d
	copii		0,24 – 1,27 µM/d

Organismul adultului conţine cca 100 - 500 mg Cu. Necesarul zilnic e de 2 – 5 mg Cu.

4. Fier (Fe) - masa atomică: 55,847

ser	adulţi	bărbaţi	16,1 – 21,1 µM/l
		femei	14,3 – 21,5 µM/l
	copii	nou-născuţi	19,3 – 27,9 µM/l
		2 luni - 1 an	8,2 – 17,4 µM/l
		pînă la 14 ani	15,2 – 26,0 µM/l
urină			17,9 µM/d

5. Fosfor (P) - masa atomică: 30,9738

ser	adulţi		0,65 – 1,61 mM/l
	sugari		1,3 – 2,3 mM/l
	copii		1,1 – 1,8 mM/l
urină	adulti		22,6 – 48,43 mM/d
	nou-născut (alăptat normal)		cca 1,29 mM/d
	nou-născut (alăptat cu lapte de vacă)		cca 9,69 mM/d
	copii	4 - 8 ani	19,37 – 25,83 mM/d
		9 - 12 ani	25,83 – 32,29 mM/d

6. Potasiu (K) - masa atomică: 39,098

ser	adulţi		3,8 – 4,7 mM/l
	sugari		4,1 – 5,4 mM/l
	copii mici		4,2 – 5,1 mM/l
	copii de şcoală		3,8 – 5,0 mM/l
elemente sanguine	adulţi		6,0 – 18,0 mM/l
urină	adulţi		25 – 100 mM/d
	copii	0 - 6 luni	0 – 25,0 mM/d
		7 - 12 luni	15- 40,0 mM/d
		1 - 3 ani	20 – 50, 0 mM/d
		4 - 6 ani	20 – 60,0 mM/d

7. Sodiu (Na) - masa atomică: 22,9898

ser	adulţi	134 – 148 mM/l
	nou-născuţi	134 – 142 mM/l
	copii mici	132 – 144 mM/l
	copii de şcoală	134 – 147 mM/l
elemente sanguine	adulţi	cca 70,0 mM/l
urină	adulţi	120 – 220 mM/d
	nou-născuţi	0 – 10,0 mM/d
	pînă la 6 luni	0 – 20,0 mM/d
	6 - 12 luni	10 – 30,0 mM/d
	1 - 7 ani	20 – 60,0 mM/d
	7 – 14 ani	60 – 120,0 mM/d

8. Magneziu (Mg) - masa atomică: 24,31

ser	adulţi		0,78 – 1,19 mM/l
	bărbaţi		0,68 – 0,93 mM/l
	femei		0,65 – 0,98 mM/l
	nou-născuţi		0,44 – 0,96 mM/l
	copii	pînă la 6 ani	0,82 ± 0,06 mM/l
		6 - 12 ani	0,68 – 0,88 mM/l
		12 - 20 ani	0,68 – 0,88 mM/l
	copii de şcoală		0,27 – 0,37 mM/l
	adulţi		1,52 – 1,93 mM/l
sînge integral			2,39 – 2,67 mM/l
eritrocite	bărbaţi		1,95 ± 0,19 mM/l
	femei		2,03 ± 0,21 mM/l
	urină		2,1 – 6,2 mM/d

9. Acetonă - masa moleculară: 58,0806

ser			28 – 88 μM/l
urină			0 – 861 μM/d

10. Acid acetoacetic - masa moleculară: 102,09

ser	adulţi		16 – 43 μM/l
plasmă	nou-născuţi	(1 - 2 zile)	249 ± 106 μM/l
		4 - 10 zile	161 ± 131 μM/l

11. Acid N-acetilneuraminic – masa moleculară: 309,28

ser			1,80 – 2,35 mM/l
plasmă			2,0 ± 0,12 mM/l
suc gastric			cca 0,24 mM/l

12. Acid α - hidroxibutiric - masa moleculară: 104,164

sînge	adulţi (nealimentaţi)		56 – 164 μM
plasmă	adulţi (nealimentaţi)		20 – 92 μM
	nou-născuţi (nealimentaţi)		470 ± 411 μM

13. Acid lactic - masa moleculară: 90,079

sînge	adulţi		0,63 - 2,2 mM/l
venos	nou-născuţi (sînge ombilical)		3,72 ± 0,73 mM/l
sînge	adulţi		0,33 - 0,78 mM/l
arterial	nou-născuţi (sînge ombilical)		0,65 - 4,00 mM/l

14. Acid piruvic - masa moleculară: 88,0635

sînge	adulţi		34 – 102 μM/l

	nou-născuţi		70 - 120 µM/l
	copii (2 - 13 ani)		56 - 96 µM/l
ser	adulţi		21 - 73 µM/l
urină	adulţi	bărbaţi	cca 0,11 mM/d
		femei	cca 0,13 mM/d
15. Acid uric - masa moleculară: 168,112			
ser	adulţi	barbaţi	155 - 420 µM/l
		femei	119 - 375 µM/l
	nou-născuţi		240 - 360 mM/l
	a pubertate		140 - 320 µM/l
urină	adulţi (alimentaţie săracă în purine)		1,48 - 4,46 mM/d
	adulţi (alimentaţie bogată în purine)		pînă la 11,9 mM/d
	copii		0,12–0,18 mM/kg corp/d
16. Albumine - masa moleculară cca 69000			
ser	adulţi		500 - 725 µM/l
	copii pînă la 14 ani		497 - 811 µM/l
17. Proteinele totale			
ser	adulţi		65 - 85 g/l
	nou-născuţi		48 - 73 g/l
	copii	pînă la 3 ani	54 - 87 g/l
		peste 3 ani	60 - 80 g/l
18. Proteine - fracţiuni electroforetice			
ser	albumine		58 - 66%
	α_1 - globuline		3 - 5 %
	α_2 - globuline		5 - 9 %
	β - globuline		6 - 14 %
	γ - globuline		10 - 24 %
	globuline totale		34 - 42 %
(separarea pe hîrtie şi acetat de celuloză standard)			
Raportul A/G = 1,0 - 1,5			
19. Azot - masa moleculară : 14,0067			
Azot total	sînge		2,14 - 2,93 M/l
	ser		0,86 - 1,08 M/l
	eritrocite		4,1 - 4,4 M/l
Azot neproteic (restant)	sînge	bărbaţi	14,4 - 25,0 mM/l
		femei	13,0 - 24,2 mM/l
		nou-născuţi	17,1 - 27,9 mM/l
Azot aminoacid	sînge		1,43 - 3,07 mM/l
Azot total	urină		0,73 - 1,45 M/d

Azot aminoacid	urină		adultul	7,1 - 35,7 mM/d

20. Amoniac - masa moleculară : 17,0306

plasmă	17 - 58 µM/l
urină	35 - 50 mM/d
salivă	1,2 - 5,9 mM/l
suc gastric	0,3 - 2,4 mM/l

21. Bilirubină - masa moleculară: 584,678

ser	adulți	totală	8,55 - 20,52 µM/l
		directă	pînă la cca 4,28 µM/l

22. Coagularea

Fibrinogenul	200 - 400 mg/dl
Protrombina	10 - 15 mg/dl
Timpul de recalcifiere plasmatic (Howell)	60 - 120 secunde
Timpul de protrombină (Quick)	12 - 15 secunde
Indicele de protrombină	80 - 120%

23. Colesterol - masa moleculara: 386,667

ser	adulți	2,6 - 6,5 mM/l
	nou-născuți	1,3 - 3,1 mM/l

24. Corpi cetonici

sînge	adulți	100 – 602 µM/l

25. Creatina - masa moleculară: 131,1

ser	adulți		bărbați	22,9 - 45,7 mM/l
	femei			22,9 - 76,2 mM/l
	copii		0 - 14 ani	17 - 82 mM/l
urină	adulți	bărbați		0,08 - 1,45 mM/kg/d
	femei			0,14 - 2,06 mM/kg/d
	copii	6 - 11 ani		0,02 - 0,06 mM/kg/d
		6 - 12 luni		0,04 - 0,16 mM/kg/d

26. Creatinină - masa moleculară: 113,1199

ser	adulți		35,4 - 106 mM/l
	nou-născuți		80 - 180 mM/l
	copii	1 - 6 ani	30 - 150 mM/l
urină	adulți	bărbați	0,077 - 0,217 mM/kg/d
		femei	0,065 - 0,189 mM/kg/d
	nou-născuți		0,09 - 0,14 mM/kg/d
	copii 1 - 6 ani		0,06 - 0,19 mM/kg/d

27. pH sînge actual (38°C) 7,35 - 7,43

28. Bicarbonat standard - masa moleculară: 61,017			
ser, plasmă	adulţi		22 - 30 mM/l
			40 - 50 mM/l
Baze tampon	adulţi		- 2 pînă la + 2 mM/l
sînge venos		bărbaţi	- 2,8 la +3 mM/l
Baze exces		femei	- 3,3 la +1,2 mM/l
sînge capilar			
29. Aldolaza (fruclozo-l,6-difosfat. EC 4.1.2.13)			
ser			0,5 - 3,1 (U/l)
			8,3 - 51,7 (nkat/l)
30. α-amilaza (EC 3.2.1.1)			
ser	adulţi		16 - 32 (U/W) ml Wohlgemuth
			55 - 109 (mkat/1)
urină			16 - 64 (U/W) ml
			55 - 219 (mkat/1)
suc pancreatic			256 - 2048 UW/ml
31. Creatinkinaza (MB)			
plasmă	adulţi		0 - 23 nkat/1
			0 - 1,4 U/l
32. Fosfataza alcalină (EC 3.1.3.1.)			
ser	adulţi		20 - 48 U/l
			333 - 800 nkat/l
			0,5 - 1,3 mM/oră/1
	copii 2 – 15 ani		38 - 138 U/l
			633 - 2300 nkat/1
33. Fosfataza acidă (EC 3.1.2.)			
ser	adulţi		4,8 - 13,5 U/l
			80 - 225 nkat/l
			0,05 - 0,13 mM/oră/1
	copii		7,8 - 21,2 U/l
			130 - 353 nkat/1
Fosfataza acidă prostatică	adulţi		pînă la 62 nkat/1
34. Lactatdehidrogenaza (EC 1.1.1.27.)			
ser	adulţi		pînă la 3334 nkat/1
			pînă la 200 mU/minut/ml
			0,8 - 4,0 mM/oră/1
35. Aspartataminotransferaza (EC 2.6.1.1.)			
ser			pînă la 16 U/l
			267 nkat/1
			0,1 - 0,45 mM/oră/1

36. Alaninaminotransferaza (EC 2.6.1.2.)			
ser			pînă la 12 U/l
			pînă la 200 nkat/ l
			0,10 - 0,68 mM/oră/l
37. Acetilcolinesteraza			
ser			160 - 340 mM/oră/l
38. Fosfolipide			
ser	adulţi		1,94 - 3.23 mM/l
	nou-născuţi		0,5 - 1,0 mM/l
	copii mici		1,0 - 2,3 mM/l
39. Glucoza - masa moleculară: 180,1589			
sînge venos	adulţi		3,33 - 5,55 mM/l (metoda cu o-toluidina)
ser, plasmă	nou-născuţi		2,50 - 5,23 mM/l (metoda cu o-toluidina)
	copii		4,16 - 5,27 mM/l (metoda cu o-toluidina)
40. Hemoglobină – masa moleculară: 644,58 (Hb/4 = 161,145)			
sînge	adulţi	bărbaţi	13 - 17 g/dl
			8,07 - 10,55 mM/l
		femei	11 - 15 g/dl
			6,83 - 9,31 mM/l
	nou-născuţi		16 - 20 g/dl
			9,92 - 12,41mM/l
	sugari		10 - 15 g/dl
			6,21 - 9,30 mM/l
	copii mici		11 - 14 g/dl
			6,83 - 8,69 mM/l
41. Lipide (totale)			
ser			400 - 800 mg/dl
Lipoproteide			350 - 750 mg/dl
Prebeta-lipoproteide		0,85 - 1,006	60 - 160 mg/dl
Beta-lipoproteide		1,006 - 1,063	360 - 640 mg/dl
Alfa-lipoproteide		1,063 - 1,21	80 - 400 mg/dl
42. Suc gastric			
Secreţia bazală	ml/h		40 - 80
Secreţia post	ml/h		
Excitaţie histaminică	ml/h		180 - 250

	pH	adulți	1,1 - 2,5
		nou-născuți	2,5 - 7,0
		6 luni	1,5 - 3,4
		7 - 12 luni	1,5 - 2,2
		1 - 15 ani	1,4 - 2,0
Aciditatea totală			40 - 60 mM/l
HCl liber			20 – 40 mM/l
HCl legat			8 - 16 mM/l
Debitul acid	1,0–4,0 mM H+/h		

43. Trigliceride - masa moleculară (trioleina): 885,445

ser, plasmă	adulți		0,85 - 1,97 mM/l

44. Uree - masa moleculară: 60,0558

sînge, ser	adulți		2,50 - 8,33 mM/l
plasmă	sugari		1,67 - 4,16 mM/l
	copii mici		2,50 – 5,83 mM/l
urină	adulți		220 - 609 mM/d
	copii	pînă la o lună	2,5 - 17 mM/d
		6 - 12 luni	33 - 67 mM/d
		1 - 2 ani	67 - 133 mM/d
		4 - 8 ani	133 - 200 mM/d
		8 - 18 ani	200 - 333 mM/d

45. Indicanul

Urină	adulți		46,0 – 56,4 mM/d

Corelația dintre culoarea luminii absorbite și substanță

Lungimea de undă a luminii absorbite, nm	Culoarea luminii absorbite	Culoarea substanței
400–435	Violetă	Galbenă – Verde
435–480	Albastră	Galbenă
480–490	Verde – Albastru	Oranj
490–500	Albastru – Verde	Roșie
500–560	Verde	Purpurie
560–580	Galben – Verde	Violetă
580–595	Galbenă	Albastră
595–605	Oranj	Verde – Albastru
605–750	Roșie	Albastru – Verde

CUPRINSUL

RĂSPUNSURI LA ÎNTREBĂRI:

CAPITOLUL V

CAPITOLUL VI

CAPITOLUL VII

Com. 2034
Firma editorial-poligrafică "Tipografia Centrală",
MD-2068, Chişinău, str. Florilor, 1
tel. 43-03-60, 49-31-46
Ministerul Culturii al Republicii Moldova
Direcţia Edituri, Poligrafie şi Aprovizionare cu Cărţi